



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0617823-5 A2



* B R P I 0 6 1 7 8 2 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 30/10/2006
(43) Data da Publicação: 09/08/2011
(RPI 2118)

(51) Int.CI.:
A61K 47/48 2006.01

(54) Título: USO DE SDF-1 PARA O TRATAMENTO
E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS
E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(30) Prioridade Unionista: 31/10/2005 EP 05 110206.9,
07/11/2005 US 60/734,142, 07/11/2005 US 60/734,142, 31/10/2005 EP
05 110206.9

(73) Titular(es): Laboratoires Serono SA

(72) Inventor(es): Amanda Proudfoot, Jérôme Wojcik, Linda Kadi,
Pierre Alain Vitte, Ursula Boschert

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006067949 de 30/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/051785de 10/05/2007

(57) Resumo: USO DE SDF-1 PARA O TRATAMENTO E/OU
PREVENÇÃO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS E COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA. A presente invenção refere-se ao uso de SDF-1, ou
de um agonista de atividade de SDF-1, para o tratamento e/ou a
prevenção de uma doença neurológica.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE SDF-1 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".

Campo da Invenção

5 A presente invenção geralmente refere-se a doenças neurológicas associadas à neuroinflamação. Mais especificamente, a presente invenção se refere ao uso de SDF-1 para a fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de uma doença neurológica.

Antecedentes da Invenção

10 Doenças neurológicas associadas à neuroinflamação.

Neuroinflamação é uma característica comum à maioria das doenças neurológicas. Muitos estímulos dão origem à neuroinflamação, a qual pode ser ou induzida por sofrimento neuronal ou oligodendrogial, ou ser uma consequência de um trauma, de uma lesão nervosa central ou periférica ou de uma infecção viral ou bacteriana. As principais consequências de neuroinflamação são (i) secreção de várias quimocinas inflamatórias por astrócitos, células microglia; e (ii) recrutamento de leucócitos adicionais, os quais estimularão adicionalmente astrócitos ou microglia. Em doenças neurodegenerativas crônicas tais como esclerose múltipla (MS), doença de Alzheimer (AD) ou esclerose lateral amiotrófica (ALS), imagina-se que a presença de neuroinflamação persistente participe da progressão da doença. Doenças neurológicas associadas com neuroinflamação também podem ser referidas como doenças inflamatórias neurológicas.

Doenças neurodegenerativas crônicas

25 Em doenças neurodegenerativas crônicas, a patologia está associada a uma reação inflamatória. Evidência recente sugere que inflamação sistêmica pode ter impacto sobre inflamação local no cérebro doente levando a síntese exagerada de citocinas inflamatórias e outros mediadores no cérebro, os quais podem, por sua vez, influenciar o comportamento (Perry, 2004). Doenças neurodegenerativas crônicas compreendem, entre outras, esclerose múltipla (MS), doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), doença de Huntington (HD), esclerose lateral amiotrófica (ALS),

atrofia sistêmica múltipla (MSA), doença de príons e Síndrome de Down.

A doença de Alzheimer (AD) é um distúrbio envolvendo deterioração em funções mentais resultantes de alterações no tecido cerebral. Isto inclui encolhimento dos tecidos cerebrais, não provocados por distúrbios dos

5 vasos sanguíneos, demência degenerativa primária e atrofia cerebral difusa.

A doença de Alzheimer também é denominada demência senil / do tipo de Alzheimer (SDAT). Evidência considerável obtida na última década corroborou a conclusão de que neuroinflamação está associada à patologia da doença de Alzheimer (AD) (Tuppo e Arias, 2005).

10 A doença de Parkinson (PD) é um distúrbio do cérebro caracterizado por tremor e dificuldade com a marcha, o movimento, e a coordenação. A doença está associada à lesão de uma parte do cérebro que controla o movimento muscular. Também é denominada paralisia *agitans* ou paralisia agitante. Crescente evidência de estudos humanos e animais sugeriram que

15 neuroinflamação é um importante contribuinte para a perda neuronal na doença de Parkinson (Gao et al., 2003).

A doença de Huntington (HD) é uma doença inflamatória neurológica hereditária autossômica dominante. A doença geralmente não se torna clinicamente aparente até a quinta década de vida, e resulta em distúrbio

20 psiquiátrico, distúrbio de movimentos involuntários, e declínio cognitivo associado à progressão inexorável para morte, tipicamente 17 anos depois do início.

Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) é um distúrbio que causa perda progressiva do controle nervoso de músculos voluntários devido à

25 destruição de células nervosas no cérebro e na medula espinhal. A esclerose lateral amiotrófica, também denominada doença de Lou Gehrig, é um distúrbio envolvendo perda do uso e do controle dos músculos. Os nervos que controlam estes músculos encolhem e desaparecem, o que resulta em perda de tecido muscular devido à falta de estimulação nervosa. Embora permaneça desconhecida a causa fundamental da esclerose lateral amiotrófica, neuroinflamação pode ter um papel chave na esclerose lateral amiotrófica (Consilvio et al., 2004).

Atrofia sistêmica múltipla (MSA) é uma doença neurodegenerativa esporádica, de início em adulto, de etiologia desconhecida. A condição pode ser única entre doenças neurodegenerativas crônicas pelo papel proeminente, se não primário, desempenhado pelas células oligodendrogliais no processo patogenético. Dados corroboram um papel para genes relacionados com inflamação em risco para MSA (Infante et al., 2005). A principal diferença com a doença de Parkinson é que os pacientes com atrofia sistêmica múltipla não respondem a tratamento com L-dopa.

Esclerose múltipla (MS) é uma doença desmielinizante inflamatória do sistema nervoso central (SNC) que toma um curso recorrente-remitente ou um curso progressivo. A esclerose múltipla não é a única doença desmielinizante. Seu complemento no sistema nervoso periférico (SNP) é a polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP). Além disso, há distúrbios monofásicos agudos, tais como a polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória denominada síndrome de Guillain-Barré (GBS) no sistema nervoso periférico, e a encefalomielite aguda disseminada (ADEM) no sistema nervoso central. Tanto a esclerose múltipla quanto a síndrome de Guillain-Barré são síndromes heterogêneas. Na esclerose múltipla, diferentes ataques exógenos junto com fatores genéticos podem resultar em um curso de doença que finalmente satisfaz os critérios diagnósticos. Em ambas as doenças, o dano axonal pode se acrescentar a uma lesão essencialmetne desmielinizante e provocar déficits neurológicos permanentes. A esclerose múltipla é um distúrbio autoimune no qual leucócitos do sistema imune lançam um ataque sobre a substância branca do sistema nervoso central (SNC). A substância cinzenta também pode estar envolvida. Embora a precisa etiologia da esclerose múltipla não seja conhecida, fatores contribuintes podem incluir infecção genética, bacteriana e viral. Em sua manifestação clássica (85% de todos os casos), caracteriza-se por fases recorrentes / remitentes alternadas, as quais correspondem a episódios de disfunção neurológica durando várias semanas por recuperação substancial ou completa (Noseworthy, 1999). Os períodos de remissão ficam mais curtos com o tempo. Muitos pacientes então entram em uma fase final da doença caracte-

rizada por perda gradual de função neurológica com recuperação parcial ou nenhuma recuperação. Isto é denominado esclerose múltipla progressiva secundária. Uma pequena proporção (~15% de todos os pacientes com esclerose múltipla) sofre um declínio gradual e ininterrupto na função neurológica depois do início da doença (esclerose múltipla progressiva primária).

Também foi mostrado que doença de Príons e a Síndrome de Down envolvem neuroinflamação (Eikelenboom et al., 2002; Hunter et al., 2004).

Doenças inflamatórias neurológicas depois de uma infecção

Algumas neuropatias tais como, por exemplo, encefalomielite disseminada aguda geralmente segue uma infecção viral ou vacinação viral (ou, muito raramente, vacinação bacteriana), sugerindo uma causa imunológica para a doença. Neuropatias periféricas inflamatórias agudas que seguem uma vacinação viral ou a síndrome de Guillain-Barré são distúrbios desmielinizantes similares com a mesma imunopatogênese presumida, mas afetam somente estruturas periféricas.

Mielopatia associada a HTLV, uma doença da medula espinhal lentamente progressiva associada à infecção pelo vírus linfotrófico de células T humanas, é caracterizada por fraqueza espástica de ambas as pernas.

As infecções do sistema nervoso central são infecções extremamente graves; a meningite afeta as membranas que circundam o cérebro e a medula espinhal; a encefalite afeta o próprio cérebro. Os vírus que infectam o sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) incluem herpesvírus, arbovírus, coxsackievírus, echovírus, e enterovírus. Algumas destas infecções afetam essencialmente as meninges (os tecidos que revestem o cérebro) e resultam em meningite; outras afetam essencialmente o cérebro e resultam em encefalite; muitas afetam tanto as meninges quanto o cérebro e resultam em meningoencefalite. A meningite é muito mais comum em crianças do que a encefalite. Os vírus afetam o sistema nervoso central de dois modos. Eles infectam e destróem diretamente as células durante a doença aguda. Depois de recuperação da infecção, a reação imune corporal à infecção algumas vezes causa dano secundário das células em torno dos nervos.

Este dano secundário (encefalomielite pós-infecciosa) resulta em a criança ter sintomas várias semanas depois de recuperação da doença aguda.

Doenças neurológicas depois de lesões

Lesão do sistema nervoso central induzida por insultos agudos incluindo trauma, hipóxia e isquemia pode afetar tanto a substância cinzenta quanto a substância branca. Lesão do SNC envolve neuroinflamação. Por exemplo, a infiltração de leucócitos no SNC depois de trauma ou inflamação é disparada em parte por hiperregulação da quimocina MCP-1 nos astrócitos (Panenka et al., 2001).

Trauma é uma lesão ou dano nervoso. Pode ser trauma da medula espinhal, o qual é dano da medula espinhal que afeta todas as funções nervosas que são controladas em e abaixo do nível da lesão, inclusive controle muscular e sensação, ou trauma cerebral, tal como trauma causado por lesão fechada da cabeça.

Hipóxia cerebral é uma falta de oxigênio especificamente para os hemisférios cerebrais, e mais tipicamente o termo é usado para se referir a uma falta de oxigênio para o cérebro inteiro. Dependendo da gravidade da hipóxia, os sintomas podem variar de confusão até dano cerebral irreversível, coma e morte.

Derrame geralmente é causado por fluxo sanguíneo reduzido (isquemia) do cérebro. Também é denominado doença ou acidente cerebro-vascular. É um grupo de distúrbios cerebrais envolvendo perda de funções cerebrais que ocorre quando é interrompido o suprimento sanguíneo para qualquer parte do cérebro. O cérebro requer cerca de 20% da circulação de sangue no corpo. O suprimento sanguíneo primário para o cérebro é através de 2 artérias no pescoço (as artérias carótidas), as quais em seguida se ramificam dentro do cérebro para múltiplas artérias as quais suprem cada uma uma área específica do cérebro. Mesmo uma breve interrupção do fluxo sanguíneo pode causar diminuições na função cerebral (déficit neurológico).

Os sintomas variam com a área do cérebro afetada e comumente incluem problemas tais como alterações na visão, alterações na fala, redução de movimento ou sensação em uma parte do corpo, ou alterações no nível de

consciência. Se o fluxo sanguíneo for diminuído por mais de uns poucos segundos, células cerebrais na área são destruídas (infartadas) causando dano permanente para esta área do cérebro ou mesmo morte.

Lesão nervosa traumática pode dizer respeito tanto ao sistema nervoso central ou ao sistema nervoso periférico. Lesão nervosa traumática, também denominada simplesmente lesão de cabeça ou lesão de cabeça fechada, se refere a uma lesão onde há dano para o cérebro devido a um golpe externo à cabeça. Acontece principalmente durante acidentes de carro ou de bicicleta, mas também podem ocorrer em consequência de quase afogamento, ataque do coração, derrame e infecções. Este tipo de lesão cerebral traumática geralmente resultaria devido à falta de oxigênio ou de suprimento sanguíneo para o cérebro, e portanto também pode ser referido como uma "lesão anóxica". Lesão cerebral ou lesão de cabeça fechada ocorre quando há um golpe na cabeça como em um acidente de veículo motorizado ou uma queda. Pode haver um período de inconsciência imediatamente depois do trauma, o qual pode durar minutos, semanas ou meses. O dano cerebral primário ocorre por ocasião da lesão, essencialmente nos locais de impacto, em particular quando está presente um fragmento de crânio. Grandes contusões podem estar associadas a uma hemorragia intracerebral, ou ser acompanhadas por lacerações corticais. Lesões axonais difusas ocorrem em consequência de forças de cisalhamento e de tração de processos neurais por movimentos rotacionais do cérebro dentro do crânio. Pode haver pequenas lesões hemorrágicas ou dano difuso para os axônios, os quais somente podem ser detectados microscopicamente. Ocorre dano cerebral secundário em consequência de complicações que desenvolvem depois do momento da lesão. Estas incluem hemorragia intracraniana, lesão traumática de artérias extracerebrais, herniação intracraniana, lesão cerebral hipóxica ou meningite.

As lesões da medula espinhal são responsáveis pela maioria das admissões hospitalares por paraplegia e tetraplegia. Mais de 80% ocorrem como um em consequência de acidentes nas estradas. Dois grupos principais de lesão são reconhecidos clinicamente: lesões fechadas e lesões

abertas. As lesões abertas causam trauma direto da medula espinhal e das raízes nervosas. Lesões perfurantes podem causar extensa disruptão e hemorragia. As lesões fechadas são responsáveis pela maioria das lesões espinhais e geralmente estão associadas a uma fratura / um deslocamento da coluna vertebral, que geralmente é demonstrável radiologicamente. A lesão da medula depende da extensão das lesões ósseas e pode ser considerada em dois estágios principais: lesão primária, as quais são contusões, transecções de fibras nervosas e necrose hemorrágica, e lesão secundária, as quais são hematoma extradural, enfarte, infecção e edema.

Trauma é a causa mais comum de uma lesão localizada para um único nervo. Atividade muscular violenta ou violenta superextensão de uma articulação podem produzir uma neuropatia focal, como podem pequenos traumas repetidos (por exemplo, o ato de agarrar com firmeza pequenas ferramentas, excessiva vibração de martelos pneumáticos). Paralisia por pressão ou paralisia por estrangulamento geralmente afeta nervos superficiais (ulnar, radial, peroneal) em proeminências ósseas (por exemplo, durante sono profundo ou durante anestesia em pessoas magras ou caquéticas e frequentemente em alcoólatras) ou em canais estreitos (por exemplo, na síndrome do túnel do carpo). Paralisia de pressão também pode resultar de tumores, hiperostose óssea, arremessos, muletas, ou posturas restringidas prolongadas (por exemplo, em jardinagem). Também podem ocorrer lesões traumáticas durante procedimentos cirúrgicos.

Neuropatia periférica

Neuropatia Periférica é uma síndrome de perda sensorial, fraqueza e atrofia muscular, diminuição dos reflexos dos tendões profundos, e sintomas vasomotores, sozinhos ou em qualquer combinação. A Neuropatia Periférica está associada à degeneração axonal, um processo também referido como degeneração Walleriana. A neuroinflamação tem um papel na degeneração Walleriana (Stoll et al., 2002).

A doença pode afetar um único nervo (mononeuropatia), dois ou mais nervos em áreas separadas (múltipla mononeuropatia), ou muitos nervos simultaneamente (polineuropatia). O axônio pode ser afetado primaria-

mente (por exemplo, no diabetes melito, doença de Lyme, uremia ou com agentes tóxicos) ou a bainha de mielina ou célula de Schwann (por exemplo, em polineuropatia inflamatória aguda ou crônica, leucodistrofias, ou síndrome de Guillain-Barré). A lesão de fibras não-mielinadas e mielinadas resulta essencialmente na perda de temperatura e sensação de dor; a lesão de fibras mielinadas grandes resulta em defeitos motores ou proprioceptivos. Algumas neuropatias (por exemplo, devido à toxicidade por chumbo, uso de dapsona, doença de Lyme (provocada por mordida de carrapato), porfiria, ou síndrome de Guillain-Barré) afetam primariamente fibras motoras; outras (por exemplo, devido à ganglionite da raiz dorsal de câncer, lepra, AIDS, diabetes melito, ou intoxicação crônica por piridoxina) afetam primariamente os gânglios da raiz dorsal ou fibras sensoriais, produzindo sintomas sensoriais. Ocasionalmente, nervos craniais também estão envolvidos (por exemplo, na síndrome de Guillain-Barré, na doença de Lyme, no diabetes melito, e na difteria). A identificação das modalidades envolvidas ajuda a determinar a causa.

Mononeuropatia múltipla é geralmente secundária a distúrbios vasculares do colágeno (por exemplo, poliarterite nodosa, SLE, síndrome de Sjögren, RA), sarcoidose, doenças metabólicas (por exemplo, diabetes, amiloidose), ou doenças infecciosas (por exemplo, doença de Lyme, infecção por HIV). Micro-organismos podem causar mononeuropatia múltipla por invasão direta do nervo (por exemplo, na lepra).

Polineuropatia devida a doenças febris agudas pode resultar de uma toxina (por exemplo, em difteria) ou uma reação autoimune (por exemplo, na síndrome de Guillain-Barré); a polineuropatia que algumas vezes se segue a imunizações provavelmente também é autoimune.

Agentes tóxicos geralmente causam polineuropatia mas algumas vezes mononeuropatia. Incluem emetina, hexobarbital, barbital, clorobutanol, sulfonamidas, fenitoína, nitrofurantoína, os vinca alcaloides, metais pesados, monóxido de carbono, fosfato de triortocresila, ortodinitrofenol, muitos solventes, outros venenos industriais, e alguns fármacos contra AIDS (por exemplo, zalcitabina, didanosina).

Neuropatia induzida por quimioterapia é um efeito colateral grave e proeminente de várias medicações quimioterápicas usadas comumente, incluindo os Vinca alcalóides (vimblastina, vincristina e vindesina), fármacos contendo platina (cisplatina) e Taxanos (paclitaxel). A indução de neuropatia periférica é um fator comum na limitação da terapia com fármacos quimioterapéticos.

Deficiências nutricionais e distúrbios metabólicos podem resultar em polineuropatia. A deficiência de vitamina é frequentemente a causa (por exemplo, em alcoolismo, beriberi, anemia perniciosa, deficiência de piridoxina induzida por isoniazida, síndromes de má absorção, e hiperemese gravídica). Polineuropatia também ocorre em hipotiroidismo, porfiria, sarcoidose, amiloidose, e uremia. Diabetes melito pode causar polineuropatia distal sensorimotora (mais comum), mononeuropatia múltipla, e mononeuropatia focal (por exemplo, dos nervos craniais abducens ou oculomotores).

Polineuropatia devido a distúrbios metabólicos (por exemplo, diabetes melito) ou falência renal se desenvolve lentamente, frequentemente durante meses ou anos. Frequentemente se inicia com anormalidades sensoriais nas extremidades inferiores que são frequentemente mais graves distalmente do que proximalmente. Formigamento periférico, entorpecimento, dor em queimação, ou deficiências na propriocepção articular e sensação vibratória são frequentemente proeminente. A dor é frequentemente pior à noite e pode ser agravada tocando a área afetada ou por alterações de temperatura. Em casos graves, há sinais objetivos de perda sensorial, tipicamente com distribuição em meia-e-luva. Os reflexos do tendão de Aquiles e outros tendões profundos estão diminuídos ou ausentes. Podem se desenvolver úlceras indolores sobre os dedos ou articulações de Charcot quando a perda sensorial é profunda. Déficits sensoriais ou proprioceptivos podem levar a anormalidades da marcha. O envolvimento motor resulta em fraqueza muscular distal e atrofia. O sistema nervoso autônomo pode ser adicionalmente ou seletivamente envolvido, levando à diarreia noturna, à incontinência urinária e fecal, à impotência, ou à hipotensão postural. Os sintomas vasomotores variam. A pele pode estar mais pálida e mais seca do que o

normal, algumas vezes com descoloração escura; a transpiração pode ser excessiva. Alterações tróficas (pele lisa e brilhante, unhas com pequenas depressões ou sulcos, osteoporose) são comuns em casos graves e prolongados.

5 Polineuropatia nutricional é comum entre alcoólatras e os desnutridos. Uma axonopatia primária pode levar a desmielinização secundária e à destruição axonal nos nervos mais longos e maiores. Não está claro se a causa é deficiência de tiamina ou de outra vitamina (por exemplo, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico). Neuropatia devido à deficiência de piridoxina
10 geralmente ocorre somente em pessoas tomando isoniazida para tuberculose; as crianças que são deficientes ou dependentes de piridoxina podem ter convulsões. Debilitação e fraqueza simétrica das extremidades distais é geralmente insidiosa mas pode progredir rapidamente, algumas vezes acompanhada por perda sensorial, parestesias, e dor. Dor, cãibras, frio, queimação,
15 e entorpecimento nas barrigas das pernas e nos pés podem ser piorados pelo toque. Podem ser administradas múltiplas vitaminas quando a etiologia é obscura, mas não têm benefício comprovado.

Neuropatias hereditárias são classificadas como neuropatias sensorimotoras ou neuropatias sensoriais. A doença de Charcot-Marie-Tooth
20 é a neuropatia sensorimotora hereditária mais comum. Neuropatias sensorimotoras menos comuns se iniciam no nascimento e resultam em mais incapacidade. Nas neuropatias sensoriais, as quais são raras, a perda da sensação de temperatura e dor distais é mais proeminente do que a perda de sensação vibratória e de posição. O principal problema é mutilação pedal devido
25 a insensibilidade à dor, com frequentes infecções e osteomielite. Neuropatias hereditárias também incluem neuropatia intersticial hipertrófica e doença de Dejerine-Sottas.

A malignidade também pode causar polineuropatia através de gamopatia monoclonal (mieloma múltiplo, linfoma), invasão amiloide, ou deficiências nutricionais ou como uma síndrome paraneoplásica.

Apesar de várias etiologias, tais como patógenos infecciosos ou ataques autoimunes, todas as doenças inflamatórias neurológicas causam

perda da função neurológica e podem levar a paralisia e morte. Embora estejam disponíveis uns poucos agentes terapêuticos reduzindo ataques inflamatórios em algumas doenças inflamatórias neurológicas, existe a necessidade de desenvolver novas terapias que podem levar à recuperação da função neurológica.

SDF-1

As quimocinas (citocinas quimiotácticas) constituem uma super-família de pequenas (8-10 kDa) citocinas que ativam sete receptores acoplados a proteína G transmembrana que estão envolvidos tanto no tráfico basal quando nas respostas inflamatórias agindo primariamente como quimoatraentes e ativadores de leucócitos.

O fator-1 α derivado de células estromais, SDF-1 α , e suas 2 isoformas (β, γ) são pequenas citocinas quimiotáticas que pertencem à família intercrina, cujos membros ativam leucócitos e são frequentemente induzidos por estímulos pró-inflamatórios tais como lipopolissacarídeo, TNF, ou IL-1. As intercrinas se caracterizam pela presença de 4 cisteínas conservadas, as quais formam 2 ligações dissulfeto. Podem ser classificadas em 2 subfamílias. Na subfamília CC, a qual inclui beta quimocina, os resíduos cisteína são adjacentes uns aos outros. Na subfamília CXC, a qual inclui alfa quimocina, eles são separados por um aminoácido interveniente. As proteínas SDF-1 pertencem ao último grupo. SDF-1 é um ligante natural do receptor de quimocina CXCR4 (LESTR/fusina). As isoformas alfa, beta e gama são uma consequência de junção alternativa de um único gene. A forma alfa é derivada dos exons 1-3 enquanto a forma beta contém uma sequência adicional de exon 4. Os três primeiros exons de SDF-1 γ são idênticos aos de SDF-1 α e SDF-1 β . O quarto exon de SDF-1 γ está localizado 3200 pb a jusante do terceiro exon sobre o lócus SDF-1 e se situa entre o terceiro exon e o quarto exon de SDF-1 β .

Três novas isoformas de SDF-1, SDF-1delta, SDF-1épsilon e SDF-1fi foram descritas recentemente (Yu et al., 2006). A isoforma SDF-1 δ é alternativamente ligada no último códon do frame de leitura aberta SDF-1 α , resultando em um ítron de 731 pares de bases, com o exon terminal de

SDF-1 α sendo dividido em dois. Os três primeiros exons de SDF-1 ε e SDF-1 ϕ são 100 % idênticos aos das isoformas SDF-1 β e SDF-1 γ .

O gene SDF-1 é expressado ubliquamente com a exceção de células sanguíneas age sobre linfócitos e monócitos mas não neutrófilos *in vitro* e é um quimioatraente altamente potente para células mononucleares *in vivo*. SDF *in vitro* e *in vivo* também age como um quimioatraente para células progenitoras hematopoiéticas humanas expressando CD34.

SDF-1 e seu receptor, CXCR4, exercem funções essenciais no sistema hematopoiético e no sistema nervoso contanto que a eliminação ou do ligante ou do receptor seja letal embrionário devido a desenvolvimento anormal do sistema nervoso central (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998).

SDF-1 α , através de interações com seu receptor CXCR4 pode induzir diretamente morte celular por apoptose na linhagem celular neuronal hNT humana, a qual se assemelha a neurônios colinérgicos pós-mitóticos imaturos e tem uma série de características neuronais (Hesselgesser et al., 1998).

O papel de SDF-1 no sistema nervoso central em desenvolvimento e maduro foi revisado por Lazarini et al. (Lazarini et al., 2003).

Quimocinas estão certamente envolvidas em neuroinflamação no sistema nervoso central, mas suas atividades se estendem a seu papel como peptídeos biologicamente importantes diretamente sobre células neuroepiteliais (incluindo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos). Em particular, quimocinas influenciam a proliferação de precursores de oligodendrócitos (OLPs), conforme ilustrado por GRO- α / CXCL1 (Robinson et al., 1998), a organização de células granulares cerebelares, no caso de SDF-1 α (Zhu et al., 2002) e estados de ativação de microglia conforme exemplificado por fractalcina/ CX3CL1 (Zujovic et al., 2000), para nomear somente uns poucos. Portanto, tanto nos paradigmas do sistema imune quanto do sistema nervoso, as quimocinas podem realizar uma ampla gama de atividades similares, incluindo regulação de proliferação, migração, ativação e diferenciação.

Muitas quimocinas e receptores de quimocinas são expressados no sistema nervoso central, quer constitutivamente ou induzidos por media-

dores inflamatórios. Estão envolvidos em muitos processos neuropatológicos, incluindo esclerose múltipla (MS) (Bajetto et al., 2001; Sorensen et al., 2002).

Foi demonstrado que a expressão de SDF-1 em células endoteliais cerebrais favorece o recrutamento de células imunes para o sistema nervoso central isquêmico (Stumm et al., 2002), sugerindo um papel prejudicial de SDF-1 na neuroinflamação. No contexto de demência da AIDS, foi descrito que SDF-1 induz neurotoxicidade estimulando a produção de TNF α por microglia ativada e liberação de glutamato por astrócitos em um modelo de neuroinflamação *in vitro* induzida gp120 (Bezzi et al., 2001; Sorensen et al., 2002). Uma recente publicação descreveu a expressão de SDF-1 α em astrócitos de lesões de esclerose múltipla (Ambrosini et al., 2005).

A indução de encefalomielite alérgica experimental (EAE) no rato foi acompanhada por níveis aumentados de vários receptores de quimocina incluindo CXCR4 (Jiang et al., 1998).

Na publicação de patente internacional No. WO 00/09152, foi dito que antagonistas de CXCR4 são úteis para o tratamento de uma doença autoimune, o tratamento de esclerose múltipla, o tratamento de câncer e inibição de angiogênese.

A WO 99/50461 descreve métodos de tratamento de distúrbios envolvendo proliferação celular aberrante ou proliferação celular deficiente administrando compostos que promovem ou inibem a atividade de CXCR4. Inibidores da função de CXCR4 foram reivindicados para o tratamento de cânceres e usos dos agonistas de receptores foram reivindicados para o tratamento de distúrbios nos quais a proliferação celular é deficiente ou é desejada. Distúrbios nos quais a proliferação celular é deficiente incluem lesões desmielinizantes do sistema nervoso nas quais uma porção do sistema nervoso é destruída ou danificada por uma doença desmielinizante incluindo, por exemplo, esclerose múltipla e lesões do sistema nervoso periférico.

Também foi sugerido o uso terapêutico de antagonistas de CXCR4/SDF-1 em doenças neurológicas. Na publicação de patente europeia No. EP657468B1, o uso de SDF-1 é sugerido para o tratamento de doenças

relativas a proliferação anormal ou subdesenvolvida de células hematopoéticas, depressão ou reforço neuronal, prevenção ou tratamento de lesão neuronal.

Na WO 03/062273, um inibidor do caminho de sinalização de SDF-1 foi descrito para o tratamento de inflamação. Os usos terapêuticos descritos incluem inflamação associada a doenças ou a condições ou a distúrbios autoimunes, onde ou no sistema nervoso central ou em qualquer outro órgão, a supressão imune e /ou de inflamação seria benéfica, crônica neuropatia ou síndrome de Guillain Barre.

Gleichmann et al. reportaram um ligeiro aumento transitório na expressão de RNAm de SDF-1-beta depois de lesão de nervo periférico. Eles concluíram que seus achados demonstram pela primeira vez um padrão de expressão diferencial para as isoformas de SDF-1 em condições fisiológicas distintas tais como desenvolvimento e lesão do sistema nervoso (Gleichmann et al., 2000).

SDF-1 pode interagir com Glicosaminoglicanos (GAGs), grupos de açúcar ramificados altamente variáveis, adicionados pós-translacionalmente a várias proteínas, denominadas genericamente proteoglicanos (PGs). As proteínas referidas estão presentes sobre a membrana celular, na matriz extracelular e na corrente sanguínea, onde GAGs isoladas também podem estar presentes. PGs, ou GAGs isolados, podem formar um complexo com moléculas solúveis, possivelmente para proteger esta molécula contra proteólise no ambiente extracelular. Também foi proposto que GAGs pode auxiliar a correta apresentação de moléculas de sinalização celular a seu receptor específico e, eventualmente, também a modulação da ativação de células-alvo.

No caso de quimocinas, a concentração em gradientes imobilizados no sítio de inflamação e, consequentemente, a interação com receptores celulares e seu estado de ativação parecem ser moduladas pelas diferentes formas de GAGs (Hoogewerf et al., 1997). Portanto, foi sugerido que a modulação de semelhantes interações pode representar uma abordagem terapêutica em doença inflamatória (Schwarz e Wells, 1999).

Um SDF-1 α modificado, SDF-1 3/6, foi gerado por substituição combinada do cluster básico dos resíduos Lys24, His25 e Lys27 por Ser (Amara et al., 1999). Este mutante foi incapaz de ligar sulfato de heparano mas manteve a capacidade de ligar e ativar o CXCR4. Outro estudo investigou 5 o efeito de mutações únicas no mesmo domínio e caracterizou o complexo de heparina de SDF-1 α (Sadir et al., 2001). Sadir et al. também sugeriram o envolvimento dos resíduos Arg41 e Lys43 na ligação de glicosaminoglicano.

Sumário da Invenção

10 É o objetivo da presente invenção proporcionar novos meios para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica.

Na estrutura da presente invenção, foi visto que a administração de SDF-1 α , Met-SDF-1 α ou SDF-1 α variante tem um efeito benéfico em um modelo animal *in vivo* de doenças neurológicas periféricas. Também foi mostrado 15 que SDF-1 α e sua variante inibem TNF- α e IL-6 no modelo animal de liberação de TNF- α induzido por LPS, o qual é um modelo de inflamação.

A evidência experimental apresentada aqui, neste requerimento de patente, proporciona portanto uma nova possibilidade de tratamento de doenças neurológicas, em particular as ligadas à função de células neurais 20 e gliais e neuroinflamação.

Portanto, a presente invenção se refere ao uso de SDF-1 ou um agonista de atividade de SDF-1, para a fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica.

De acordo com a presente invenção, SDF-1 também pode ser usado 25 em combinação com um interferon ou osteopontina ou clusterina para tratamento e/ou prevenção de doenças neurológicas. O uso de moléculas de ácido nucleico, vetores de expressão compreendendo SDF-1, e de células expressando SDF-1, para tratamento e/ou prevenção de uma doença neurológica também está dentro da presente invenção.

30 A invenção adicionalmente proporciona composições farmacêuticas compreendendo SDF-1 e um interferon ou osteopontina ou clusterina opcionalmente junto com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitá-

veis

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 mostra o teor de TNF- α e IL-6 em pg/ml de culturas corticais mistas pré-incubadas no dia 14 de cultura celular com 0,001, 0,1 e 5 10 ng/ml de SDF-1 α (1.A) ou SDF-1 α variante (1.B) por três horas a 37°C e em seguida suplementada com 5 ng/ml de LPS por 48 horas. Os sobrantes foram coletados no dia 16 e os níveis de TNF- α e IL-6 foram medidos através de ELISAs específicos. Como controles positivos, as culturas foram tratadas com 25 pM de dexametasona (Dexa), 10 ng/ml de IL-10 ou não tratadas. Como controle negativo, as culturas foram tratadas com LPS somente.

10 A figura 2 mostra o número total médio de células $\times 10^6 \pm$ s.e. recrutado na cavidade peritoneal em 4 horas depois de injeção intra peritoneal de 200 μ l de NaCl (0,9%, livre de LPS; Linha basal) ou 4 μ g de SDF-1 α 15 ou SDF-1 α variante diluído em 200 μ l de NaCl (0,9%, livre de LPS).

A figura 3 mostra o teor de SDF-1 α em picograma por micrograma de proteína total (pg/mg) de extratos da medula espinhal dissecados de camundongos afetados com EAE na fase crônica comparados com camundongos não tratados (controles).

20 A figura 4 mostra os registros eletrofisiológicos de camundongos, depois de compressão de um nervo ciático, tratados com Veículo (Solução Salina / 0,02% de BSA), 3, 10, 30, ou 100 μ g/kg s.c. de SDF-1 α e 30 μ g /kg de um composto controle de referência (positivo) (IL-6). Linha basal: valores registrados sobre o lado contralateral de animais tratados com Veículo.

25 Os registros foram realizados no dia 7, 15 e 22 pós-lesão (dpl).

4.A representa a amplitude em milivolt (mV) do potencial de ação muscular do composto.

4.B mostra a latência em milissegundos (ms) do potencial de ação muscular do composto.

30 A figura 5 mostra os registros eletrofisiológicos de camundongos, depois de compressão de um nervo ciático, tratados com Veículo (Solução Salina / 0,02% de BSA) ou 30 μ g/kg s.c. de SDF-1 α variante. Linha ba-

sal: valores registrados sobre o lado contralateral de animais tratados com Veículo. Os registros foram realizados no dia 7 e 22 pós-lesão (dpl).

5.A representa a amplitude em milivolt (mV) do potencial de ação muscular do composto.

5.B mostra a latência em milissegundos (ms) do potencial de ação muscular do composto.

5.C mostra a duração em milissegundos (ms) do potencial de ação muscular do composto.

A figura 6 mostra os registros eletrofisiológicos de camundongos, depois de compressão de um nervo ciático, tratados com Veículo (Solução Salina / 0,02% de BSA) ou 100, 30, 10 µg/kg s.c. of Met-SDF-1 α . Linha basal: valores registrados sobre o lado contralateral de animais tratados com Veículo. Os registros foram realizados no dia 7 e 14 pós-lesão (dpl).

6.A mostra a latência em milissegundos (ms) do potencial de ação muscular do composto.

A figura 7 mostra os resultados de 100, 30, 10 µg/kg s.c. Tratamento com SDF-1 α no modelo de neuropatia diabética por estreptozotocina (STZ). A molécula de controle positivo é IL-6 a 10µg/kg s.c.

7.A representa a medição do peso corporal iniciando no dia 11 até o dia 40

7.B representa os níveis de glicemia no dia 7 pós -STZ

7.C mostra a latência do potencial de ação muscular do composto medida no dia 24 e 40 pós-STZ

7.D mostra o efeito de SDF-1 α sobre a velocidade da condução nervosa sensorial

7.E representa a espessura relativa de mielina no dia 40 pós-STZ com e sem tratamento com SDF-1 α expressado como a proporção g

7.F mostra o número de fibras degeneradas no nervo ciático no dia 40 pós-STZ

7.G representa a densidade de fibras nervosas intraepidérmicas no dia 40 pós-STZ

A figura 8 mostra os resultados de tratamento com 100, 30, 10

$\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c. de SDF-1 α sobre leituras da alodinia mecânica e térmica no modelo de neuropatia diabética por estreptozotocina (STZ).

8.A representa a pressão limiar medida no Teste do Filamento de Von Frey no dia 20 pós-STZ

5 8.B representa a medição da latência no teste de placa quente a 52°C no dia 40 pós-STZ

A figura 9 mostra o falso índice de descoberta estimado sobre o conjunto de esclerose múltipla progressiva primária italiana plotado contra o número de marcadores R positivos para R<100.

10 A figura 10 mostra o SNP_A-2185631 no gene SDF-1.

A figura 11 mostra as sequências de aminoácidos previstas de variantes de junção SDF-1 humanos.

A figura 12 mostra que SNP_A-2185631 está no gene SDF-1, localizado no último ítron de SDF-1 ϵ e SDF-1 ϕ .

15 Descrição Detalhada da Invenção

Na estrutura da presente invenção, foi visto que a administração de SDF-1 tem um efeito benéfico em um modelo animal *in vivo* de doenças neurológicas periféricas. Em um modelo murino de neuropatia induzida por compressão do nervo ciático, todos os parâmetros fisiológicos relativos à regeneração, à integridade e à vitalidade nervosas foram influenciados positivamente por administração de SDF-1 α , Met-SDF-1 α ou variante SDF-1 α .

Foi mostrado que SDF-1 α e variante SDF-1 α inibem TNF- α e IL-6 no modelo animal de liberação de TNF- α induzido por LPS, o qual é um modelo genérico de neuroinflamação.

25 Um efeito protetor de SDF-1 α em neuropatia diabética e dor neuropática é mostrado na presente invenção.

Além disso, foi vista uma associação genética entre gene SDF-1 e esclerose múltipla progressiva primária.

A evidência experimental apresentada aqui, neste requerimento de patente, proporciona portanto uma nova possibilidade de tratar doenças neurológicas, em particular as ligadas com função celular neuronal e glial e neuroinflamação.

A invenção portanto se refere ao uso de SDF-1 ou de um agonista de atividade de SDF-1, para a fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de uma doença neurológica.

O termo "SDF-1", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, se refere a SDF-1 α maduro humano de extensão total ou um fragmento do mesmo tendo atividade de SDF-1, tal como, por exemplo, sua ligação ao receptor CXCR4. A sequência de aminoácidos de SDF-1 α humano é reportada aqui, neste requerimento de patente, como SEQ ID NO: 1 da listagem de sequência anexada. O termo "SDF-1", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, adicionalmente se refere a qualquer SDF-1 derivado de animais, tais como SDF-1 murino, bovino, ou de rato, na medida que haja suficiente identidade de modo a manter a atividade de SDF-1.

O termo "SDF-1", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, adicionalmente se refere a muteínas biologicamente ativas e fragmentos, tais como as isoformas de SDF-1 que ocorrem naturalmente. Foram reportadas seis variantes de transcriptos alternativamente ligados do gene codificando isoformas distintas de SDF-1 (SDF-1 isoformas α , β , γ , δ , ϵ e ϕ). As sequências de SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ e SDF-1 ϕ humanas são reportadas aqui, neste requerimento de patente, como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16, respectivamente, da listagem de sequência anexada.

O termo "SDF-1", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, engloba adicionalmente isoformas, muteínas, proteínas fundidas, derivados funcionais, frações ativas, fragmentos ou sais das mesmas. Estas isoformas, muteínas, proteínas fundidas ou derivados funcionais, frações ativas ou fragmentos conservam a atividade biológica de SDF-1. Preferencialmente, têm uma atividade biológica, a qual é melhorda comparada com o SDF-1 selvagem.

O termo "SDF-1" em particular inclui a isoforma madura humana SDF-1 α identificada pela SEQ ID NO:1, SDF-1 β madura humana identificada pela SEQ ID NO:2 SDF-1 γ madura humana identificada pela SEQ ID NO:3 SDF-1 δ madura humana identificada pela SEQ ID NO:14, SDF-1 ϵ madura

humana identificada pela SEQ ID NO:15 e SDF-1 ϕ madura humana identificada pela SEQ ID NO:16; a isoforma madura humana SDF-1 α tendo uma Metionina de N-terminal adicional e sendo identificada pela SEQ ID NO: 7; formas truncadas de SDF-1 α tais como as formas correspondentes aos resíduos aminoácido 4-68 de SDF-1 α madura humana e sendo identificada pela SEQ ID NO:8, a correspondente aos resíduos aminoácidos 3-68 de SDF-1 α madura humana e sendo identificadas pela SEQ ID NO:9, e a correspondente aos resíduos aminoácidos 3-68 de SDF-1 α madura humana tendo uma Metionina de N-terminal adicional e sendo identificada pela SEQ ID NO:10.

10 Também englobadas pelo termo SDF-1 estão proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo SDF-1 conforme definido acima encadeado operavelmente a um domínio heterólogo, por exemplo, uma ou mais sequências de aminoácidos as quais podem ser escolhidas entre as seguintes: um domínio extracelular de uma proteína ligada à membrana, a regiões constantes

15 de imunoglobulina (região Fc), a domínios de multimerização, a sinais de exportação, e a sequências de rótulo (tais como sequências ajudando a purificação por afinidade: rótulo HA, rótulo de Histidina, GST, peptídeos FLAAG, ou MBP. São preferenciais proteínas de fusão-Fc de SDF-1 α conforme definido pela SEQ ID NO: 13.

20 O termo " variante SDF-1 α ", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, se refere a um mutante de SDF-1 tendo uma atividade de ligação de GAG reduzida. A expressão "uma atividade de ligação de GAG reduzida" ou "ligação de GAG defeituosa" significa que os mutantes de CC-quimocina têm uma menor capacidade para ligar a GAGs, isto é, uma menor percentagem de cada um destes mutantes liga a GAGs (como sulfato de heparina) com respeito à molécula selvagem correspondente, conforme medido com os testes na técnica anterior citada seguinte descrevendo os referidos mutantes. Em particular, o referido mutante é o mutante já descrito na técnica anterior com as substituições Lys24 His25 e Lys27 por Ser (Amarra et al J Biol Chem. 1999 Aug 20;274(34):23916-25) ou por Ala (SEQ ID NO: 4). Outros mutantes de ligação de GAG defeituosa podem ser gerados por substituição combinada do cluster básico dos resíduos Lys24, His25 e

Lys27 e quaisquer outros resíduos envolvidos na ligação de glicosaminoglicano, por exemplo, Arg41 e Lys43 com Ser e/ou Ala. Combinações possíveis podem ser, por exemplo, Lys24 Lys27, Lys24 His25, His25 Lys27, Lys24 Arg 41, His25 Arg41, Lys27 Arg41, Lys24 Lys43, His 25 Lys43, Lys27 5 Lys43, e Arg41 Lys43.

O termo " variante SDF-1 α " em particular engloba o mutante de SDF-1 α tendo atividade de ligação de GAG reduzida e sendo identificado pela SEQ ID NO: 4 (mutante triplo de SDF-1 α tendo Lys24Ala, His25Ala, Lys27Ala); o mutante de SDF-1 α tendo um resíduo Metionina inicial adicional e tendo a mutação tripla Lys25Ala, His26Ala, Lys28Ala, conforme identificado pela SEQ ID NO: 11; e o mutante de SDF-1 α de atividade de ligação de GAG reduzida tendo uma única mutação Lys27Cys e sendo identificado pela SEQ ID NO: 12. As variantes SDF-1 α conforme aqui, neste requerimento de patente, definido, e em particular a variante SDF-1 α identificada pela 10 SEQ ID NO: 12 pode ser modificada com PEG (polietilenoglicol), um processo conhecido como "PEGuilação." PEGuilação pode ser realizada por quaisquer das reações de PEGuilação conhecidas na técnica (vide, por exemplo, 15 a EP 0 154 316).

SDF-1 e variante SDF-1 α conforme definido aqui, neste requerimento de patente, e tendo uma eliminação do aminoácido de C-terminal também são incluídas na invenção.

Formas particularmente preferenciais de SDF-1 tendo uma eliminação do aminoácido de C-terminal são formas truncadas de SDF-1 α tais como a forma correspondente aos resíduos aminoácidos 3-67 de SDF-1 α 25 madura humana e sendo identificadas pela SEQ ID NO:17, e uma correspondente aos resíduos aminoácido 3-67 de SDF-1 α madura humana tendo uma Metionina de N-terminal adicional e sendo identificada pela SEQ ID NO:18

O termo "agonista da atividade de SDF-1", conforme usado aqui, 30 neste requerimento de patente, se refere a uma molécula estimulando ou imitando a atividade de SDF-1, tal como anticorpos agonistas do receptor de SDF-1, ou agonistas de pequeno peso molecular ativando sinalização atra-

vés de um receptor de SDF-1, por exemplo, o receptor de CXCR4.

O termo "agonista da atividade de SDF-1", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, também se refere a agentes reforçando atividades mediadas por SDF-1, tais como promoção de fixação de células a componentes da matriz extracelular, morfogênese de células da linhagem de oligodendrócitos em células produtoras de mielina, promoção do recrutamento, proliferação, diferenciação ou maturação de células da linhagem de oligodendrócitos (tais como células precursoras ou progenitoras), ou promoção da proteção de células da linhagem de oligodendrócitos de apoptose e lesão celular. Atividades similares de SDF-1 também se aplicam a células de Schwann.

Em uma modalidade preferencial da invenção, SDF-1 é SDF-1 α .

Em uma modalidade adicionalmente preferencial da invenção, SDF-1 é SDF-1 α variante.

Os termos "tratar" e "prevenir", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, deve ser entendido como prevenir, inibir, atenuar, melhorar ou reverter um ou mais sintomas ou causas de doença neurológica, bem como sintomas, doenças ou complicações que acompanham doença neurológica. Ao "tratar" doença neurológica, as substâncias de acordo com a invenção são administradas depois do início da doença, "prevenção" se refere à administração das substâncias antes de poderem ser notados sinais de doença no paciente.

O termo "doenças neurológicas", conforme usado aqui, neste requerimento de patente, engloba todas as doenças ou distúrbios neurológicos conhecidos, ou lesões do SNC ou do SNP, incluindo as descritas em detalhes nos "Antecedentes da invenção".

Doenças neurológicas compreendem distúrbios ligados à disfunção do SNC ou do SNP, tais como doenças relacionadas a neurotransmissão, cefaleia, trauma da cabeça, infecções do sistema nervoso central, distúrbios neuro-oftalmológicos e de nervos cranianos, função e disfunção do lobos cerebrais, distúrbios de movimento, estupor e coma, doenças desmielinizantes, delírio e demência, anormalidades da junção craniocervical, dis-

túrbios de ataque apoplético, distúrbios da medula espinhal, distúrbios do sono, distúrbios do sistema nervoso periférico, doença cerebrovascular, ou distúrbios musculares. Para definições destes distúrbios, vide por exemplo, The Merck Manual for Diagnosis and Therapy, Seventeenth Edition, publicado pelos Merck Research Laboratories, 1999.

Ocorre neuroinflamação em doenças neurológicas distintas. Muitos estímulos dão origem a neuroinflamação, a qual pode ser ou induzida por sofrimento neuronal ou oligodendroglial, ou ser uma consequência de um trauma, de uma lesão nervosa central ou periférica ou de uma infecção viral ou bacteriana. As principais consequências da neuroinflamação são (i) secreção de várias quimocinas inflamatórias por astrócitos, células microglia; e (ii) recrutamento de leucócitos adicionais, o qual estimulará adicionalmente astrócitos ou microglia. Em doenças crônicas neurodegenerativas tais como esclerose múltipla (MS), doença de Alzheimer (AD) ou esclerose lateral amiotrófica (ALS), imagina-se que a presença de neuroinflamação persistente participe da progressão da doença. Doenças neurológicas associadas com neuroinflamação também podem ser referidas como doenças inflamatórias neurológicas.

Em uma modalidade preferencial da invenção, a doença neurológica está associada à inflamação, em particular neuroinflamação.

Preferencialmente, as doenças neurológicas da invenção são selecionadas entre o grupo consistindo em lesão nervosa traumática, derrame, doenças desmielinizantes do sistema nervoso central ou do sistema nervoso periférico, neuropatias e doenças neurodegenerativas.

Lesão nervosa traumática pode dizer respeito ao sistema nervoso periférico ou ao sistema nervoso central, e pode ser trauma cerebral ou da medula espinhal, incluindo paraplegia, conforme descrito nos "antecedentes da invenção" acima.

Em modalidades preferenciais da invenção, a lesão nervosa traumática compreende trauma de um nervo periférico ou trauma da medula espinhal.

Derrame pode ser causado por hipóxia ou por isquemia do cére-

bro. Também é denominado doença ou acidente cerebrovascular. Derrame pode envolver perda de funções cerebrais (déficits neurológicos) causados por uma perda de circulação sanguínea para áreas do cérebro. A perda de circulação sanguínea pode ser devido a coágulos sanguíneos que se formam no cérebro (trombo), ou partes de placa aterosclerótica ou outro material que se desloca para o cérebro a partir de outra localização (êmbolos). Sangramento (hemorragia) dentro do cérebro pode causar sintomas que simulam derrame. A causa mais comum de um derrame é derrame secundário a aterosclerose (trombose cerebral), e portanto a invenção também se refere ao tratamento da aterosclerose.

Neuropatia periférica pode ser relacionada a uma síndrome de perda sensorial, fraqueza e atrofia muscular, diminuição dos reflexos de tendões profundos, e sintomas vasomotores, sozinhos ou em qualquer combinação. Neuropatia pode afetar um único nervo (mononeuropatia), dois ou mais nervos em áreas separadas (mononeuropatia múltipla), ou muitos nervos simultaneamente (polineuropatia). O axônio pode ser primariamente afetado (por exemplo, no diabetes melito, na doença de Lyme, ou na uremia ou com agentes tóxicos), ou a bainha de mielina ou célula de Schwann (por exemplo, na polineuropatia inflamatória aguda ou crônica, nas leucodistrofias, ou na síndrome de Guillain-Barré). Neuropatias adicionais, as quais podem ser tratadas de acordo com a presente invenção, podem ser devidos, por exemplo, à toxicidade por chumbo, ao uso de dapsona, à mordida de carrapato, à porfiria, ou à síndrome de Guillain-Barré, e podem afetar primariamente as fibras motoras. Outras, tais como as devidos à ganglionite das raízes dorsais de câncer, à lepra, a AIDS, a diabetes melito, ou à intoxicação crônica por piridoxina, podem afetar primariamente os gânglios das raízes dorsais ou as fibras sensoriais, produzindo sintomas sensoriais. Nervos cranianos também podem estar envolvidos, tal como, por exemplo, na síndrome de Guillain-Barré, na doença de Lyme, no diabetes melito, e na difteria.

A doença de Alzheimer é um distúrbio envolvendo deterioração das funções mentais resultante de alterações no tecido cerebral. Isto pode incluir encolhimento dos tecidos cerebrais, demência degenerativa primária e

atrofia cerebral difusa. A doença de Alzheimer também é denominada demência senil / do tipo Alzheimer (SDAT).

A doença de Parkinsons é um distúrbio do cérebro incluindo tremor e dificuldade com a marcha, o movimento, e a coordenação. A doença é associada a dano de uma parte do cérebro que controla o movimento muscular, e também é denominada paralisia agitans ou paralisia agitante.

A doença de Huntington é uma doença neurológica autossômica dominante hereditária. A anormalidade genética consiste em um número em excesso de sequências de nucleotídeos CAG repetidas em série. Outras doenças com repetições CAG incluem, por exemplo, atrofias musculares espinais (SMA), tais como doença de Kennedy, e a maioria das ataxias cerebelares autossômicas dominantes (ADCAs) que são conhecidas como ataxias espinocerebelares (SCAs) na nomenclatura genética.

A esclerose lateral amiotrófica, ALS, é um distúrbio que causa perda progressiva do controle nervoso de músculos voluntários, incluindo a destruição de células nervosas no cérebro e na medula espinhal. A esclerose lateral amiotrófica, também denominada doença de Lou Gehrig, é um distúrbio que envolve a perda do uso e do controle dos músculos.

Esclerose múltipla (MS) é uma doença desmielinizante inflamatória do sistema nervoso central (SNC) que toma um curso recorrente-remitente ou um progressivo. MS não é a única doença desmielinizante. Seu complemento no sistema nervoso periférico (SNP) é a polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP). Além disso, há distúrbios monofásicos agudos, tais como a polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória denominada síndrome de Guillain-Barré (GBS) no sistema nervoso periférico, e encefalomielite aguda disseminada (ADEM) no SNC. Distúrbios neurológicos adicionais compreendem neuropatias com mielinação anormal, tais como os distúrbios neurológicos listados nos "Antecedentes da invenção" acima, bem como a síndrome do túnel do carpo. Lesão nervosa traumática pode ser acompanhada por complicações ortopédicas da coluna vertebral, e estas também estão dentro das doenças de acordo com a presente invenção.

Doenças neurológicas menos conhecidas de modo geral também estão dentro do âmbito da presente invenção, tais como neurofibromatose, ou Atrofia Sistêmica Múltipla (MSA). Distúrbios adicionais que podem ser tratados de acordo com a presente invenção foram descritos em detalhes nos "Antecedentes da invenção" acima.

Em uma modalidade adicionalmente preferencial, a doença neurológica é uma neuropatia periférica, ainda mais preferencialmente neuropatia diabética. Neuropatias associadas / induzidas por quimioterapia também são preferenciais de acordo com a presente invenção.

O termo "neuropatia diabética" se refere a qualquer forma de neuropatia diabética, ou a um ou mais sintomas ou distúrbios acompanhando ou causados por neuropatia diabética, ou complicações de diabetes afetando os nervos conforme descrito em detalhes nos "Antecedentes da invenção" acima. Neuropatia diabética pode ser uma polineuropatia. Na polineuropatia diabética, muitos nervos são afetados simultaneamente. A neuropatia diabética também pode ser uma mononeuropatia. Na mononeuropatia focal, por exemplo, a doença afeta um único nervo, tal como o nervo craniano oculomotor ou abducens. Também pode ser mononeuropatia múltipla quando dois ou mais nervos são afetados em áreas separadas.

Em uma modalidade adicionalmente preferencial, o distúrbio neurológico é uma doença desmielinizante. Doenças desmielinizantes preferencialmente compreendem condições desmielinizantes do sistema nervoso central, como encefalomielite aguda disseminada (ADEM) e esclerose múltipla (MS), bem como doenças desmielinizantes do sistema nervoso periférico (SNP). Os últimos compreendem doenças tais como polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP) e distúrbios monofásicos agudos, tais como a polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória denominada síndrome de Guillain-Barré (GBS).

Em uma modalidade adicionalmente preferencial, a doença desmielinizante é esclerose múltipla.

Em uma modalidade particularmente preferencial da invenção, a doença desmielinizante é esclerose múltipla progressiva primária.

Em outra modalidade particularmente preferencial da invenção, a doença desmielinizante é esclerose múltipla progressiva secundária. Em ainda uma modalidade preferencial adicional, a doença desmielinizante é selecionada entre esclerose múltipla inflamatória crônica, polineuropatia desmielinizante (CIDP) e síndrome de Guillain-Barré (GBS),

Uma modalidade preferencial adicional da invenção se refere ao tratamento e/ou à prevenção de uma doença neurodegenerativa. A doença neurodegenerativa é selecionada entre o grupo consistindo em doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e ALS.

10 Preferencialmente, o SDF-1 é selecionado entre um peptídeo, um polipeptídeo ou uma proteína selecionada entre o grupo consistindo em:

- (a) polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 1
- (b) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID

NO: 4

15 (c) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 7

(d) um polipeptídeo de (a) a (c) compreendendo adicionalmente uma sequência de sinal, preferencialmente aminoácidos de SEQ ID NO: 5

20 (e) uma mutéína de qualquer um de (a) a (d), em que a sequência de aminoácidos tem pelo menos 40 % ou 50 % ou 60 % ou 70 % ou 80 % ou 90 % de identidade com pelo menos uma das sequências em (a) a (d);

25 (f) uma mutéína de qualquer um de (a) a (d) a qual é codificada por uma sequência de DNA a qual hibridiza ao complemento da sequência de DNA nativa codificando qualquer um de (a) a (d) sob condições altamente estringentes;

(g) uma mutéína de qualquer um de (a) a (d) em que quaisquer alterações na sequência de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservativas para as sequências de aminoácidos em (a) a (d);

30 (h) um sal ou uma isoforma, proteína fundida, derivado funcional, ou fração ativa de qualquer um de (a) a (d).

Frações ativas ou fragmentos podem compreender qualquer porção ou domínio de qualquer uma das isoformas SDF-1, tais como uma

porção N-terminal de uma porção C-terminal, ou quaisquer das isoformas SDF-1.

Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que mesmo porções menores de SDF-1 podem ser suficientes para exercer sua função, tais como um peptídeo ativo compreendendo os resíduos aminoácidos essenciais requeridos para função de SDF-1, tal como, por exemplo, sua ligação ao receptor CXCR4. A ligação de receptor pode ser medida, por exemplo, expondo o receptor imobilizado a seu ligante marcado e proteína de teste não-marcada, por meio do que uma redução na ligação de ligante marcado comparada com um controle é indicativa de atividade de ligação de receptor na proteína de teste. Em outro ensaio, a Espectroscopia de Ressonância de Plasmon Superficial, o receptor ou a proteína a ser analisada é imobilizada sobre um chip sensor chato em uma câmara de escoamento, depois da qual uma solução contendo um parceiro de interação prospectiva é passado sobre a primeira proteína em um fluxo contínuo, a Luz é dirigida em um ângulo definido através do chip e é medido o ângulo de ressonância da luz refletida; o estabelecimento de uma interação proteína-proteína causa uma alteração no ângulo (por exemplo, BIACore®, Biacore International AB). Outras técnicas adequadas para analisar interações proteína-proteína (por exemplo, cromatografia por afinidade, blotting por afinidade e coimunoprecipitação) ou para avaliar afinidades de ligação (por exemplo, cromatografia por afinidade de proteína, sedimentação, filtração por gel, métodos de fluorescência, amostragem de fase sólida de soluções de equilíbrio, e ressonância de plasmon superficial) foram revisadas por Phizicky EM e Fields S. (Phizicky and Fields, 1995; Sadir et al., 2001).

Uma pessoa versada na técnica reconhecerá adicionalmente que mutações, sais, isoformas, proteínas fundidas, derivados funcionais ou frações ativas de SDF-1, conservarão uma atividade biológica similar, ou mesmo melhor, de SDF-1. A atividade biológica de SDF-1 e mutações, isoformas, proteínas fundidas ou derivados funcionais, frações ativas ou fragmentos ou sais dos mesmos, pode ser medida em bioensaio, usando um sistema celular.

Frações ativas preferenciais têm uma atividade a qual é igual ou melhor do que a atividade de SDF-1 de extensão total, ou a qual tem vantagens adicionais, tais como uma melhor estabilidade ou uma menor toxicidade ou imunogenicidade, ou são mais fáceis de produzir em grandes quantidades, ou mais fáceis de purificar. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que muteínas, fragmentos ativos e derivados funcionais podem ser gerados clonando o DNAc correspondente em plasmídeos apropriados e testando os mesmos no ensaio celular, conforme mencionado acima.

As proteínas de acordo com a presente invenção podem ser glicosiladas ou não-glicosiladas, podem ser derivadas de fontes naturais, tais como fluidos corporais, ou preferencialmente podem ser produzidas de modo recombinante. Expressão recombinante pode ser realizada em sistemas de expressão procarióticos tais como *E. coli*, ou em eucarióticos, tais como células de insetos, e preferencialmente em sistemas de expressão mamíferos, tais como células CHO ou células HEK. Além disso, as proteínas da invenção podem ser modificadas, estendidas ou encurtadas, removendo ou adicionando N-terminalmente uma Metionina (Met) ou amino-oxipentano (AOP), na medida que os efeitos neuroprotetores sejam conservados.

Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, o termo "muteínas" se refere a análogos de SDF-1, nos quais um ou mais dos resíduos aminoácidos de um SDF-1 natural são substituídos por diferentes resíduos aminoácidos, ou são eliminados, ou um ou mais resíduos aminoácidos são adicionados à sequência natural de SDF-1, sem alterar consideravelmente a atividade dos produtos resultantes comparados com o SDF-1 selvagem. Estas muteínas são preparadas por síntese conhecida e/ou por técnicas de mutagênese sítio-dirigida, ou qualquer outra técnica conhecida adequada para esse fim.

Muteínas de SDF-1, as quais podem ser usadas de acordo com a presente invenção, ou ácido nucleico codificando as mesmas, incluem uma série finita de sequências substancialmente correspondentes como peptídeos ou polinucleotídeos de substituição as quais podem ser obtidas rotineiramente por uma pessoa de conhecimento regular da técnica, sem indevida

experimentação, com base nos ensinamentos e orientação apresentados aqui, neste requerimento de patente.

Muteínas de acordo com a presente invenção incluem proteínas codificada por um ácido nucleico, tais como DNA ou RNA, o qual hibridiza a 5 DNA ou RNA, o qual codifica SDF-1, de acordo com a presente invenção, sob condições moderadamente ou altamente estringentes. O cDNA codificando SDF-1 α é descrito como SEQ ID NO 6. O termo "condições estringentes" se refere à hibridização e a condições de lavagem subsequentes, as quais as pessoas versadas na técnica se referem convencionalmente como 10 "estringentes". Vide Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 e 6.4 (1987, 1992), e Sambrook et al. (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., e Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

15 Sem limitação, exemplos de condições estringentes incluem condições de lavagem 12-20°C abaixo da Tm calculada do híbrido em estudo em, por exemplo, 2 x SSC e 0,5% de SDS por 5 minutos, 2 x SSC e 0,1% de SDS por 15 minutos; 0,1 x SSC e 0,5% de SDS a 37°C por 30 a 60 minutos e em seguida, um 0,1 x SSC e 0,5% de SDS a 68°C por 30 a 60 minutos.

20 As pessoas versadas na técnica entendem que as condições de estringência também dependem da extensão das sequências de DNA, sondas de oligonucleotídeos (tais como 10 a 40 bases) ou sondas de oligonucleotídeos mistas. Se forem usadas sondas mistas, é preferencial usar cloreto de tetrametil amônio (TMAC) ao invés de SSC. Vide Ausubel, supra.

25 Em uma modalidade preferencial, qualquer muteína semelhante tem pelo menos 40% de identidade ou homologia com as sequências de SEQ ID NO: 1 a 4 da listagem de sequência anexada. Mais preferencialmente, tem pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou, ainda mais preferencialmente, pelo menos 90% de identidade ou 30 homologia com as mesmas.

Identidade reflete uma relação entre duas ou mais sequências de polipeptídeos ou duas ou mais sequências de polinucleotídeos, determi-

nada comparando as sequências. Em geral, identidade se refere a uma correspondência exata de nucleotídeo para nucleotídeo ou aminoácido para aminoácido dos dois polinucleotídeos ou duas sequências de polipeptídeos, respectivamente, sobre a extensão das sequências sendo comparadas.

5 Para sequências onde não há uma correspondência exata, pode ser determinada uma "% de identidade". Em geral, as duas sequências a serem comparadas são alinhadas para dar uma máxima correlação entre as sequências. Isto pode incluir "intervalos" de inserção em qualquer uma ou ambas as sequências, para reforçar o grau de alinhamento. Uma % de identidade pode ser determinada sobre a extensão inteira de cada uma das sequências sendo comparadas (denominadas alinhamento global), que é particularmente adequada para sequências da mesma extensão ou de extensão muito similar, ou sobre extensões mais curtas definidas (denominadas alinhamento local), que é mais adequada para sequências de extensão desigual.

10 Métodos para comparar a identidade e a homologia de duas ou mais sequências são de conhecimento geral na técnica. Portanto, por exemplo, programas disponíveis no pacote de análise de sequências Wisconsin Sequence Analysis Package, versão 9.1 (Devereux et al., 1984), por exemplo, os programas BESTFIT e GAP, podem ser usados para determinar a % de identidade entre dois polinucleotídeos e a % de identidade e a % de homologia entre duas sequências de polipeptídeos. BESTFIT usa o algoritmo de "homologia local" de Smith e Waterman (Smith e Waterman, 1981) e descobre a melhor região única de similaridade entre duas sequências. Outros 15 programas para determinar a identidade e/ou similaridade entre sequências também são conhecidos na técnica, por exemplo, a família de programas BLAST (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997), acessível através da home page da NCBI em www.ncbi.nlm.nih.gov e FASTA (Pearson, 1990; Pearson e Lipman, 1988).

20 Alterações preferenciais para mutações de acordo com a presente invenção são as que são conhecidas como substituições "conservativas". Substituições de aminoácidos conservativas de polipeptídeos SDF-1, podem

incluir aminoácidos sinônimos dentro de um grupo os quais têm propriedades fisicoquímicas suficientemente similares em que a substituição entre membros do grupo preservará a função biológica da molécula (Grantham, 1974). É evidente que inserções e eliminações de aminoácidos também podem ser feitas nas sequências definidas acima sem alterar sua função, particularmente se as inserções ou eliminações somente envolverem uns poucos aminoácidos, por exemplo, abaixo de treze, e preferencialmente abaixo de dez, e não removerem ou deslocarem aminoácidos os quais são cruciais para uma conformação funcional, por exemplo, resíduos cisteína. Proteínas e mutoéinas produzidas por semelhantes eliminações e/ou inserções estão dentro do alcance da presente invenção.

Preferencialmente, os grupos de aminoácidos sinônimos são aqueles definidos na Tabela I. Mais preferencialmente, os grupos de aminoácidos sinônimos são aqueles definidos na Tabela II; e o mais preferencialmente os grupos de aminoácidos sinônimos são aqueles definidos na Tabela III.

Tabela I

Grupos Preferenciais de Aminoácidos Sinônimos

	<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo Sinônimo</u>
20	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
	Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
25	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
	Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
	Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
	Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
30	Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
	His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His

	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
5	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

Tabela II

Grupos Mais Preferenciais de Aminoácidos Sinônimos

	<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo Sinônimo</u>
10	Ser	Ser
	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, Ile, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
15	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
20	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
25	Gln	Glu, Gln, His
	Asn	Asp, Asn
	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
30	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
	Trp	Trp

Tabela III

Grupos Mais Preferenciais de Aminoácidos Sinônimos

	<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo Sinônimo</u>
5	Ser	Ser
	Arg	Arg
	Leu	Leu, Ile, Met
	Pro	Pro
	Thr	Thr
10	Ala	Ala
	Val	Val
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Leu
	Phe	Phe
15	Tyr	Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His
	Gln	Gln
	Asn	Asn
20	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
	Met	Met, Ile, Leu
	Trp	Met

Exemplos de produção de substituições de aminoácidos em proteínas os quais podem ser usados para obter mutações de SDF-1, polipeptídeos ou proteínas, para uso na presente invenção incluem quaisquer etapas de métodos conhecidos, tal como apresentada nas patentes dos Estados Unidos N°s 4.959.314, 4.588.585 e 4.737.462, para Mark et al; N° 5.116.943 para Koths et al., N° 4.965.195 para Namen et al; N° 4.879.111 para Chong et al; e N° 5.017.691 para Lee et al; e proteínas substituídas com lisina apresentadas na patente dos Estados Unidos N° 4.904.584 (Shaw et al).

O termo "proteína fundida" se refere a um polipeptídeo compre-

endendo SDF-1, ou uma mutoéina ou fragmento do mesmo, fundido a outra proteína, a qual tem, por exemplo, uma duração da permanência prolongada nos fluidos corporais. Um SDF-1 pode portanto ser fundido a outra proteína, polipeptídeo ou similar, por exemplo, uma imunoglobulina ou um fragmento 5 do mesmo.

"Derivados funcionais" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, cobre derivados de SDF-1, e suas mutoéinas e proteínas fundidas, os quais podem ser preparados a partir dos grupos funcionais que ocorrem como cadeias laterais sobre os resíduos ou os grupos N- ou 10 C-terminais, por meios conhecidos na técnica, e são incluídos na invenção contanto que permaneçam farmaceuticamente aceitáveis, isto é, não destruam a atividade da proteína que é substancialmente similar à atividade de SDF-1, e não confirmam propriedades tóxicas a composições contendo estes.

Estes derivados podem incluir, por exemplo, cadeias laterais de 15 polietileno glicol, as quais podem mascarar sítios antigênicos e prolongar a permanência de um SDF-1 nos fluidos corporais. Outros derivados incluem ésteres alifáticos dos grupos carboxila, amidas dos grupos carboxila por reação com amônia ou com aminas primárias ou secundárias, derivados de N-acila de grupos amino livres dos resíduos aminoácidos formados com porções acila (por exemplo, grupos alcanoíla ou aroíla carbocíclicos) ou derivados de O-acila de grupos oxidrila livres (por exemplo, os de resíduos serila 20 ou treonila) formados com porções acila.

Como "frações ativas" de SDF-1, mutoéinas e proteínas fundidas, a presente invenção cobre qualquer fragmento ou precursores da cadeia de 25 polipeptídeo da molécula de proteína somente ou junto com moléculas associadas ou resíduos encadeados a essa, por exemplo, resíduos de açúcar ou fosfato, ou agregados da molécula de proteína ou dos resíduos de açúcar sozinhos, contanto que a referida fração tenha atividade substancialmente similar a SDF-1.

O termo "sais" aqui, neste requerimento de patente, se refere a 30 ambos os sais de grupos carboxila e a sais de adição de ácido de grupos amino de molécula SDF-1 ou análogos dos mesmos. Sais de um grupo car-

boxila podem ser formados por meios conhecidos na técnica e incluem sais inorgânicos, por exemplo, sais de sódio, cálcio, amônio, férricos ou de zinco, e similares, e sais com bases orgânicas como as formadas, por exemplo, com aminas, tais como trietanolamina, arginina ou lisina, piperidina, procaína 5 e semelhantes. Sais de adição de ácido incluem, por exemplo, sais com ácidos minerais, tais como, por exemplo, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, e sais com ácidos orgânicos, tais como, por exemplo, ácido acético ou ácido oxálico. Logicamente, quaisquer dos sais referidos devem conservar a atividade biológica de SDF-1 relevante para a presente invenção, isto é, efeito 10 neuroprotector em uma doença neurológica.

Em uma modalidade preferencial da invenção, SDF-1 é fundido a uma molécula de veículo, um peptídeo ou uma proteína que estimula o cruzamento da barreira sanguínea cerebral ("BSC"). Isto serve para orientação apropriada da molécula para o sítio de ação nestes casos, nos quais o 15 sistema nervoso central está envolvido na doença. Modalidades para liberação de fármacos através da barreira sanguínea cerebral acarretam disruptão da barreira sanguínea cerebral, ou por meio osmótico ou bioquimicamente pelo uso de substâncias vasoativas tais como bradicinina. Outras estratégias para passar através da barreira sanguínea cerebral podem acarretar 20 o uso de sistemas de transporte endógenos, incluindo transportadores mediados por veículos tais como veículos de glicose e aminoácido; transcrição mediada por receptores para insulina ou transferrina; e transportadores de efluxo ativos tais como p-glicoproteína; Penetratin, um peptídeo de 16 mero (pAntp) derivado do terceiro domínio helicoidal da homeoproteína An- 25 tennapedia, e seus derivados. Estratégias para liberação de fármacos atrás da barreira sanguínea cerebral incluem adicionalmente implantação intracerebral.

Derivados funcionais de SDF-1 podem ser conjugados a polímeros de modo a melhorar as propriedades da proteína, tais como a estabilidade, a meia-vida, a biodisponibilidade, a tolerância pelo corpo humano, ou a imunogenicidade. Para atingir esta meta, SDF-1 pode ser encadeado, por exemplo, a Polietileno glicol (PEG). Pode ser realizada PEGilação por mé- 30

todos conhecidos, descritos na WO 92/13095. Por exemplo, SDF-1 α pode ser peguilado nos resíduos envolvidos na ligação de glicosaminoglicano, por exemplo, Lys24, His25, Lys27, Arg41 ou Lys43.

Portanto, em uma modalidade preferencial da presente invenção, SDF-1 é PEGuilado.

Em uma modalidade adicionalmente preferencial da invenção, a proteína fundida compreende uma fusão de imunoglobulina (Ig). A fusão pode ser direta, ou através de um curto peptídeo encadeador o qual pode ser tão curto quanto 1 a 3 resíduos aminoácidos de extensão ou mais longo, por exemplo, 13 resíduos aminoácidos de extensão. O referido encadeador pode ser um tripeptídeo da sequência E-F-M (Glu-Phe-Met), por exemplo, ou uma sequência encadeadora de 13 aminoácidos compreendendo Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introduzidos entre a sequência SDF-1 e a sequência de imunoglobulina, por exemplo. A proteína de fusão resultante tem propriedades aprimoradas, tais como uma duração da permanência prolongada nos fluidos corporais (meia-vida), ou uma aumentada atividade específica, aumentando nível de expressão. A fusão de Ig também pode facilitar a purificação da proteína fundida.

Em ainda uma outra modalidade preferencial, SDF-1 é fundido à região constante de uma molécula de Ig. Preferencialmente, é fundido a regiões de cadeia pesada, como os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana, por exemplo. Outras isoformas de moléculas de Ig também são adequadas para a geração de proteínas de fusão de acordo com a presente invenção, tais como isoformas IgG₂ ou IgG₄, ou outras classes de Ig, como IgM, por exemplo. Proteínas de fusão podem ser monoméricas ou multiméricas, hetero- ou homomultiméricas. A porção de imunoglobulina da proteína fundida pode ser adicionalmente modificada de modo a não ativar a ligação de complemento ou a cascata de complemento ou ligar a receptores de Fc.

Proteínas de fusão adicionais de SDF-1 podem ser preparadas fundindo domínios isolados de outras proteínas permitindo a formação ou dímeros, trímeros, e etc. Exemplos para sequências de proteínas permitindo a multimerização dos polipeptídeos da Invenção são domínios isolados de

proteínas tais como hCG (WO 97/30161), colágeno X (WO 04/33486), C4BP (WO 04/20639), proteínas Erb (WO 98/02540), ou peptídeos de espiral espiralada (WO 01/00814).

A invenção adicionalmente se refere ao uso de uma combinação
5 de SDF-1 e um agente imunossupressor para a fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de distúrbios neurológicos, para uso simultâneo, sequencial ou separado. Agentes imunossupressores podem ser esteróides, metotrexato, ciclofosfamida, anticorpos anti-leucócitos (tais como CAMPATH-1), e similares.

10 A invenção adicionalmente se refere ao uso de uma combinação de SDF-1 e um interferon e/ou osteopontina e/ou clusterina, para a fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de distúrbios neurológicos, para uso simultâneo, sequencial, ou separado.

O termo "interferon", conforme usado no presente requerimento
15 de patente, pretende incluir qualquer molécula definida como tal na literatura, compreendendo, por exemplo, quaisquer tipos de IFNs mencionados na seção "Antecedentes da Invenção" acima. O interferon pode ser preferencialmente humano, mas também derivado de outras espécies, contanto que a atividade biológica seja similar aos interferons humanos, e a molécula não
20 seja imunogênica no homem.

Em particular, quaisquer tipos de IFN- α , IFN- β e IFN- γ estão incluídos na definição acima. IFN- β é o IFN preferencial de acordo com a presente invenção.

O termo "beta-interferon (β -IFN)", conforme usado na presente
25 invenção, pretende incluir interferon de fibroblastos humanos, conforme obtido por isolamento de fluidos biológicos ou conforme obtido por técnicas de DNA recombinante a partir de células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas bem como seus sais, derivados funcionais, variantes, análogos e fragmentos.

30 De particular importância é uma proteína que foi derivada ou combinada com um agente formador de complexo para ser de longa duração. Por exemplo, podem ser usadas versões PEGuiladas, conforme men-

cionado acima, ou proteínas produzidas por engenharia genética para apresentar atividade de longa duração no corpo, de acordo com a presente invenção.

O termo "derivados" pretende incluir somente os derivados que
5 não alteram um aminoácido para outro dos vinte aminoácidos naturais que ocorrem comumente.

Interferons também podem ser conjugados a polímeros de modo a melhorar a estabilidade das proteínas. Um conjugado entre β Interferon e o poliol Polietileno glicol (PEG) foi descrito na publicação de patente internacional No. WO 99/55377, por exemplo.
10

Em outra modalidade preferencial da invenção, o interferon é Interferon- β (IFN- β), e mais preferencialmente IFN- β 1a.

SDF-1 é preferencialmente usado simultaneamente, sequencialmente, ou separadamente com o interferon.

15 Em uma modalidade preferencial da presente invenção, SDF-1 é usado em uma quantidade de cerca de 0,001 a 1 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal ou cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mg/kg de peso corporal ou cerca de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

A invenção adicionalmente se refere ao uso de uma molécula de
20 ácido nucleico para fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de ácido nucléicode SEQ ID NO: 6 ou uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada entre o grupo consistindo em:

25 (a) polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 1
(b) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 4

(c) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 7

30 (d) um polipeptídeo de (a) a (c) compreendendo adicionalmente uma sequência de sinal, preferencialmente aminoácidos de SEQ ID NO: 5
(e) uma mureína de qualquer um de (a) a (d), em que a sequên-

cia de aminoácidos tem pelo menos 40 % ou 50 % ou 60 % ou 70 % ou 80 % ou 90 % de identidade com pelo menos uma das sequências em (a) a (c);

(f) uma mutéina de qualquer um de (a) a (d) a qual é codificada por uma sequência de DNA a qual hibridiza ao complemento da sequência de DNA nativa codificando qualquer um de (a) a (c) sob condições altamente estringentes;

(g) uma mutéina de qualquer um de (a) a (d) em que quaisquer alterações na sequência de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservativas para as sequências de aminoácidos em (a) a (c);

(h) um sal ou uma isoforma, proteína fundida, derivado funcional, ou fração ativa de qualquer um de (a) a (d).

O ácido nucleico pode ser administrado, por exemplo, como uma molécula de ácido nucleico nu, por exemplo, por injeção intramuscular.

Portanto pode compreender sequências de vetores, tais como sequência viral, útil para expressão do gene codificado pela molécula de ácido nucleico no corpo humano, preferencialmente nas células ou tecidos apropriados.

Portanto, em uma modalidade preferencial, a molécula de ácido nucleico compreende adicionalmente uma sequência de vetor de expressão.

Sequências de vetores de expressão são de conhecimento geral na técnica, compreendem elementos adicionais servindo para expressão do gene de interesse. Podem compreender sequência regulatórias, tais como sequências promotoras e reforçadoras, sequências de marcadores de seleção, origem de multiplicação, e semelhantes. Uma abordagem terapêutica genética é portanto usada para tratar e/ou prevenir a doença. Vantajosamente, a expressão de SDF-1 será então *in situ*.

Em uma modalidade preferencial, o vetor de expressão é um vetor derivado lentiviral. Foi mostrado que vetores lentivirais são mais eficientes na transferência de genes, em particular dentro do sistema nervoso central. Outros vetores virais bem estabelecidos, tais como vetores derivados adenovirais, também podem ser usados de acordo com a invenção.

Um vetor direcionado pode ser usado de modo a reforçar a pas-

sagem de SDF-1 através da barreira sanguínea cerebral. Os referidos vetores podem ser orientados, por exemplo, o receptor de transferrina ou outros mecanismos de transporte endotelial.

Em uma modalidade preferencial da invenção, o vetor de expressão pode ser administrado por injeção intramuscular.

O uso de um vetor para induzir e/ou reforçar a produção endógena de SDF-1 em uma célula normalmente silenciosa para expressão de SDF-1, ou a qual expressa quantidades de SDF-1 as quais não são suficientes, também é contemplado de acordo com a invenção. O vetor pode compreender sequências regulatórias funcionais nas células desejadas para expressar SDF-1. As referidas sequências regulatórias podem ser promotoras ou reforçadoras, por exemplo. A sequência regulatória pode ser então introduzida no lócus apropriado do genoma por recombinação homóloga, deste modo encadeando operavelmente a sequência regulatória com o gene, cuja expressão é requerido que seja induzida ou reforçada. A tecnologia é geralmente referida como "ativação de gene endógeno" (EGA), e é descrita, por exemplo, na WO 91/09955.

A invenção adicionalmente se refere ao uso de uma célula que tenha sido modificada geneticamente para produzir SDF-1 na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de doenças neurológicas.

A invenção adicionalmente se refere a uma célula que tenha sido modificada geneticamente para produzir SDF-1 para fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de doenças neurológicas. Portanto, uma abordagem terapêutica celular pode ser usada de modo a liberar o fármaco às partes apropriadas do corpo humano.

A invenção adicionalmente se refere a composições farmacêuticas, particularmente úteis para prevenção e/ou tratamento de doenças neurológicas, as quais compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de SDF-1 e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um interferon e/ou osteopontina e/ou clusterina opcionalmente e adicionalmente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um imunossupressor.

A definição de "farmaceuticamente aceitável" significa englobar qualquer veículo, o qual não interfere com a eficácia da atividade biológica do ingrediente ativo e que não é tóxico para o hospedeiro ao qual é administrado, ou que pode aumentar a atividade. Por exemplo, para administração 5 parenteral, a uma ou mais proteínas ativas podem ser formuladas em uma forma de dosagem unitária para injeção em veículos tais como salina, solução de dextrose, albumina sérica e solução de Ringer.

Os ingredientes ativos da composição farmacêutica de acordo com a invenção podem ser administrados a um indivíduo em uma variedade 10 de modos. As vias de administração incluem vias intradérmica, transdérmica (por exemplo, em formulações de liberação lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, oral, epidural, tópica, intratecal, retal, e intra-nasal. Pode ser usada qualquer outra via de administração terapeuticamente eficaz, por exemplo, absorção através de tecidos epiteliais ou endoteliais ou 15 por terapia genética em que uma molécula de DNA codificando o agente ativo é administrada ao paciente (por exemplo, através de um vetor), o que faz com que o agente ativo seja expressado e secretado *in vivo*.

Além disso, a uma ou mais proteínas de acordo com a invenção podem ser administradas junto com outros componentes de agentes biologicamente ativos tais como tensoativos, excipientes, veículos, diluentes e veículos farmaceuticamente aceitáveis. 20

Para administração parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intramuscular), a uma ou mais proteínas ativas podem ser formuladas como uma solução, suspensão, emulsão ou pó liofilizado em associação 25 com um veículo parenteral farmaceuticamente aceitável (por exemplo, água, solução salina, solução de dextrose) e aditivos que mantêm isotonicidade (por exemplo, manitol) ou estabilidade química (por exemplo, preservantes e tampões). A formulação é esterilizada por técnicas usadas comumente.

A biodisponibilidade da uma ou mais proteínas ativas de acordo 30 com a invenção também pode ser melhorada usando procedimentos de conjugação os quais aumentam a meia-vida da molécula no corpo humano, por exemplo, encadeando a molécula a polietileno glicol (PEG), conforme descri-

to no Pedido de Patente PCT Nº WO 92/13095.

As quantidades terapeuticamente eficazes da(s) proteína(s) ativa(s) serão uma função de muitas variáveis, incluindo o tipo de proteína, a afinidade da proteína, qualquer atividade citotóxica residual apresentada pelos antagonistas, a via de administração, a condição clínica do paciente (incluindo a necessidade de manter um nível não-tóxico de atividade de SDF-1 endógeno).

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é tal que quando administrado, o SDF-1 exerce um efeito benéfico sobre a doença neurológica.

A dosagem administrada, como doses únicas ou múltiplas, a um indivíduo variará dependendo de uma variedade de fatores, incluindo as propriedades farmacocinéticas de SDF-1, a via de administração, as condições e características do paciente (sexo, idade, peso corporal, saúde, altura), da extensão dos sintomas, dos tratamentos simultâneos, da frequência do tratamento e do efeito desejado.

Conforme mencionado acima, SDF-1 pode ser usado preferencialmente em uma quantidade de cerca de 0,001 a 1 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal ou cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mg/kg de peso corporal ou cerca de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

A via de administração, a qual é preferencial de acordo com a invenção, é administração por via subcutânea. A administração intramuscular é adicionalmente preferencial de acordo com a invenção.

Em modalidades preferenciais adicionais, SDF-1 é administrado diariamente ou a cada dois dias.

As doses diárias são geralmente administradas em doses divididas ou em forma de liberação gradual eficaz para obter os resultados desejados. Segundo ou subsequentes administrações podem ser realizadas em uma dosagem a qual é a mesma, menor do que ou maior do que a dose prévia ou inicial administrada ao indivíduo.

De acordo com a invenção, SDF-1 pode ser administrado profilaticamente ou terapeuticamente a um indivíduo antes de, simultaneamente ou

sequencialmente com outros regimes ou agentes terapêuticos (por exemplo, regimes de múltiplos fármacos), em uma quantidade terapeuticamente eficaz, em particular com um interferon. Agentes ativos que são administrados simultaneamente com outros agentes terapêuticos podem ser administrados 5 nas mesmas ou em diferentes composições.

A invenção adicionalmente se refere a um método para tratar uma doença neurológica compreendendo administrar a um paciente que necessite do mesmo uma quantidade eficaz de SDF-1, ou de um agonista de atividade de SDF-1, opcionalmente junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. 10

Um método para tratar uma doença neurológica compreendendo administrar a um paciente que necessite do mesmo uma quantidade eficaz de SDF-1, ou de um agonista de atividade de SDF-1, e um interferon, opcionalmente junto com um veículo farmaceuticamente aceitável, também está 15 dentro da presente invenção.

Um método para tratar uma doença neurológica compreendendo administrar a um paciente que necessite do mesmo uma quantidade eficaz de SDF-1, ou de um agonista de atividade de SDF-1, e osteopontina, opcionalmente junto com um veículo farmaceuticamente aceitável, também está 20 dentro da presente invenção.

Um método para tratar uma doença neurológica compreendendo administrar a um paciente que necessite do mesmo uma quantidade eficaz de SDF-1, ou de um agonista de atividade de SDF-1, e clusterina, opcionalmente junto com um veículo farmaceuticamente aceitável, também está 25 dentro da presente invenção.

Todas as referências citadas aqui, neste requerimento de patente, incluindo artigos de jornal ou sumários, requerimentos de patente estrangeira ou dos Estados Unidos publicados ou não-publicados, patentes estrangeiras ou dos Estados Unidos emitidas ou quaisquer outras referências, 30 são inteiramente incorporados por meio de referência aqui, neste requerimento de patente, incluindo todos os dados, tabelas, figuras e texto apresentados nas referências citadas. Adicionalmente, os teores integrais das

referências citadas dentro das referências citadas aqui, neste requerimento de patente, também são inteiramente incorporados por meio de referência.

Referência a etapas de métodos conhecidos, etapas de métodos convencionais, métodos conhecidos ou métodos convencionais não é de modo alguma uma admissão de qualquer aspecto, descrição ou modalidade da presente invenção é descrito, ensinado ou sugerido na técnica relevante.

Portanto a descrição precedente das modalidades específicas revelará totalmente a natureza geral da invenção que outros podem, aplicando conhecimento dentro do conhecimento da técnica (incluindo os teores das referências citadas aqui, neste requerimento de patente), modificar e/ou adaptar prontamente para várias aplicações das modalidades específicas referidas, sem indevida experimentação, sem se afastar do conceito geral da presente invenção. Portanto, pretende-se que as adaptações e modificações referidas estejam dentro do significado de uma série de equivalentes das modalidades descritas, com base no ensinamento e orientação apresentados aqui, neste requerimento de patente. Deve ser entendido que a fraseologia ou terminologia aqui, neste requerimento de patente, é para os fins de descrição e não de limitação, de tal modo que a terminologia ou fraseologia da presente especificação deve ser interpretada pelo técnico versado à luz dos ensinamentos e orientação apresentados aqui, neste requerimento de patente, em combinação com o conhecimento de uma pessoa ordinariamente versada na técnica.

Tendo agora descrito a invenção, será mais prontamente entendido por meio de referência aos exemplos seguintes que são proporcionados a título de ilustração e não se pretende que sejam limitantes da presente invenção.

Exemplos

SDF-1 α e variante SDF-1 α de quimocinas recombinantes humanas foram produzidas in-house. As sequências codificantes (SEQ ID NO: 1 para SDF-1 α e SEQ ID NO: 4 para variante SDF-1 α) foram clonadas no sítio Nde1/BamHI do vetor pET20b+ e expressadas em células de E.Coli.

EXEMPLO 1: Culturas corticais mistas de atividade de SDF-1 e variante

SDF-1 tratadas com LPS

Introdução

Embora considerado um sítio imunologicamente privilegiado, o SNC pode apresentar reações inflamatórias significativas, as quais podem 5 desempenhar um papel em uma série de doenças neurológicas. Microglias parecem ser particularmente importantes para a iniciação e a sustentação de inflamação do SNC. Estas células existem em uma forma quiescente no sistema nervoso central normal, mas adquirem propriedades semelhantes aos macrófagos (incluindo fagocitose ativa, regulação para cima de proteínas 10 necessárias para apresentação antigenica e produção de citocinas pró-inflamatórias) e estimulação por infecções ou células T.

Este ambiente inflamatório *in vitro* e *in vivo* pode ser simulado por lipopolissacarídeo (LPS), um componente das membranas externas de bactérias Gram-negativas. LPS é o melhor exemplo caracterizado de reconhecimento inato que leva a uma robusta reação inflamatória por células fagocíticas através do Toll receptor 4. LPS tem sido amplamente usado na área para ativar microglias em culturas puras, coculturas ou culturas mistas. Baixos níveis de LPS induzem liberação de citocina sem induzir morte celulae, maiores doses podem induzir degeneração neuronal ou de oligodendró- 20 citos *in vitro* (Lehnardt et al., 2002; Sadir et al., 2001) e *in vivo* (Lehnardt et al., 2003; Sadir et al., 2001).

Materiais e métodos

Preparação de culturas corticais mistas primárias

A cultura de células primárias foi realizada conforme descrito 25 (Lubetzki et al., 1993) usando tecido cerebral de embriões isolados de camundongos NMRI em 16 dias pós-coito. Os hemisférios cerebrais foram dissecados de cérebros de embriões, dissociados através de digestão por tripsina e a única suspensão celular foi semeada a 5×10^4 células em 50 μ l de meio de mielinação por cavidade sobre lâminas de 96 cavidades revestidas 30 com poli-L-lisina BioCoat® (356516, Becton Dickinson). O meio de mielinação consistiu em meio de Bottenstein-Sato (Bottenstein e Sato, 1979; Sadir et al., 2001), suplementado com 1% de FCS, 1% de solução de penicilina-

estreptomicina (Seromed) e fator de crescimento derivado de plaquetas recombinante AA (PDGF-AA, R&D Systems) a 10 ng/mL.

Tratamento de Culturas corticais mistas primárias com LPS: Set up do ensaio

5 Para o set up da liberação de citocinas a partir de culturas corticais mistas primárias estimuladas com LPS, as culturas foram cultivadas a 37°C e 10% de CO₂ por 14 dias e em seguida foram estimuladas por 48 horas com concentrações crescentes de lipopolissacarídeo (0, 0,5, 1, 2,5, 5 ng/ml).

10 Depois de 48 horas de estimulação com lipopolissacarídeo, 80 µl de sobrenadantes foram coletadas e congeladas a -80 °C antes de análise do teor de:

- liberação de citocina (TNF-α e IL-6), analisada através do kit de inflamação de camundongo CBA (BD Biosciences 552364)SDF-1

15 - SDF-1 α usando o set up do sanduíche ELISA in-house e descrito aqui abaixo.

- viabilidade celular avaliada usando um teste de MTS (Ensaio de Proliferação Celular Não-Radioativa, Promega G5421; que mede a atividade mitocondrial através da formação de um sal de formazano insolúvel que tenha sido demonstrado que se correlaciona com a densidade celular).

ELISA de SDF-1 α

Um sanduíche ELISA para quantificação dos níveis de SDF-1 α em culturas corticais mistas foi estabelecido in-house. Para revestimento foram usados 100 µl/ cavidade de SDF-1 anti-camundongo monoclonal

25 (1:500 R&D Systems Inc, Minneapolis, EUA), foram usados 100 µl/ cavidade de IgG anti-camundongo policlonal biotinilado (1:400 R&D Systems Inc, Minneapolis, EUA) como anticorpo secundário e 100 µl/ cavidade de peroxidase de rábano-silvestre conjugada à extravidina (1:5000 Sigma, St. Louis, MO, EUA). SDF-1 de camundongo recombinante (2000 a 10 ng/ml de R&D Sys-

30 tems Inc, Minneapolis, EUA) foi usado para realizar a curva-padrão. Para visualização, foram usados 100 µl/ cavidade de pacote de reagente de substrato uma mistura de peróxido de hidrogênio estabilizado e tetrametilbenzidi-

na (R&D Systems Inc, Minneapolis, EUA). A densidade ótica foi medida usando uma leitora de fluoroplaca (Labsystems Multiskan EX) a 450 nm.

Efeitos de SDF-1 α e variante SDF-1 α sobre a expressão de citocina em culturas estimuladas com LPS

5 Para testar os efeitos de SDF-1 α e variante SDF-1 α (conforme definido na SEQ ID NO: 4) sobre culturas estimuladas com LPS, as células foram deixadas para crescer por duas semanas. No dia 14, as células foram pré-incubadas com concentrações crescentes (0,001, 0,1 e 10 ng/ml) das proteínas correspondentes em 25 μ l de meio por três horas a 37°C e 10% de
10 CO₂. LPS foi em seguida suplementado para as células na concentração de 5 ng/ml em 25 μ l de meio para obter um volume final de 100 μ l e incubado pr 48 horas. Os sobre-nadantes foram coletados no dia 16 e os níveis de TNF- α e IL-6 (as principais citocinas liberadas por microglia ativada) foram medi-
dos através de ELISAs específicos adquiridos dos sistemas R&D (DuoSet
15 TNF- α de camundongo ELISA DY410, IL-6 de camundongo ELISA DY406).

Foram usadas duas moléculas de controle, dexametasona e IL-10 de camundongo, as quais foram demonstradas que inibir a liberação de citocina a partir de microglia ativada.

Análise de Dados

20 Foi realizada análise global dos dados usando ANOVA one-way. Teste de Dunnett foi usado adicionalmente, e os dados foram comparados com as "células não-tratadas". O nível de significância foi determinado em a: p < 0,001; b ou **: p < 0,01; c ou *: p < 0,05; d: p < 0,1 . Os resultados foram expressados como média \pm erro padrão da média (s.e.m.).

25 Resultados

Set up do ensaio

A secreção de TNF- α , IL-6 foi induzida por LPS a 2,5 e 5 ng/ml e ambas as doses não foram tóxicas em culturas complexas. Além disso, as várias concentrações de LPS (0, 0,5, 1, 2,5, 5 ng/ml) não influenciaram os
30 níveis endógenos de SDF-1 α (resultados não mostrados).

SDF-1 α e variante SDF-1 α

Os resultados mostraram que IL-10 a 10 ng/ml e Dexametasona

(25 pM) regularam para baixo TNF- α e IL-6 comparados com células não tratadas. Tanto SDF-1 α quanto SDF-1 α variante diminuíram significativamente os níveis de secreção de TNF- α e IL-6 nas culturas corticais mistas depois de estimulação com LPS comparados com células não-tratadas e 5 com uma melhor concentração de 10 ng/ml (Fig .1A e 1B).

Conclusões

As culturas corticais mistas constituem um sistema complexo que inclui vários tipos de células neuroepiteliais incluindo astrócitos, microglia, neurônios e oligodendrócitos. O não-mutante de ligação GAG de SDF-10 α , variante SDF-1- α , reduziu TNF- α e IL-6 em uma maneira similar a SDF-1 α indicando que a mutação GAG não afeta a ligação de SDF-1 α a seu receptor CXCR4.

A inibição de citocinas vista com SDF-1 α e variante SDF-1 α em culturas corticais mistas tratadas com LPS pode ser devida a uma ação direta de SDF-1 sobre microglia ou um efeito indireto sobre neurônios ou astrócitos expressando receptores CXCR4.

De acordo com seu curso clínico, a esclerose múltipla pode ser classificada em várias categorias, estratificando os pacientes com esclerose múltipla com diferentes padrões de atividade da doença. Pacientes com só 20 mente raras recaídas seguidas por completa recuperação de sua doença são considerados como tendo MS benigna. MS Recorrente-Remitente (R-RMS), a forma mais comum de esclerose múltipla, é observada em 85 a 90 % dos pacientes com esclerose múltipla e se caracteriza por recaídas recorrentes seguidas por fases de recuperação com déficits residuais. Os ataques 25 são provavelmente causados pelo tráfego de células T reativas à mielina no SNC, causando inflamação aguda. Com o tempo, a extensão de recuperação das recaídas é diminuída e aumenta a incapacidade neurológica basal. Essencialmente, aproximadamente 40 % dos pacientes com RRMS não têm mais ataques mas desenvolvem um distúrbio secundário neurodegenerativo 30 progressivo relacionado à inflamação crônica do SNC, conhecido como MS Progressiva Secundária (SPMS) (Confavreux et al., 2000). A evolução a esta forma progressiva secundária da doença é associada a significativamente

menos lesões ativas e uma redução no volume do parênquima cerebral. Enquanto a RRMS precoce é sensível à imunossupressão, a responsividade à imunoterapia diminui na SPMS e pode mesmo desaparecer em formas tardias. Portanto, pode ser sugerida a hipótese de que a RRMS e a SPMS são 5 um continuum ao invés de duas doenças, onde eventos inflamatórios agudos precoces levam à indução secundária de um processo neurodegenerativo.

A forma Progressiva Primária de MS (PPMS) é caracterizada a partir do início pela ausência de ataques agudos e ao invés envolve um declínio clínico gradual. Clinicamente, esta forma da doença é associada com 10 uma falta de resposta a qualquer forma de imunoterapia. Pouco se sabe sobre a patobiologia da Esclerose Múltipla Progressiva Primária, no entanto, estudos post-mortem sugerem que a neurodegeneração é predominante sobre inflamação nestes pacientes. Interessantemente o dano da substância cinzenta prognostica a evolução de MS progressiva primária sendo o mais 15 forte prognosticador paraclínico de piora de incapacidade subsequente (Rovaris 2006). A ativação de microglia na substância cinzenta pode contribuir para perda neuronal acelerada e desenvolvimento de atrofia cerebral. Portanto variantes SDF-1alfa e SDF-1 podem ter um potencial no tratamento da esclerose múltipla progressiva primária, devido a seu potencial para regular 20 a ativação de microglia e a sobrevida neuronal. Alguns dos mecanismos patofisiológicos levando à perda neuronal podem ser sobrepostos nas formas de MS primária e secundária.

EXEMPLO 2: Efeito de variante SDF-1 α sobre o recrutamento de leucócitos em um modelo *in vivo* do Recrutamento de células peritoneais

25 A principal função das quimocinas é controlar a migração de populações de leucócitos específicas durante reações inflamatórias e vigilância imune. As quimocinas exercem seus efeitos biológicos por ligação a sete receptores acoplados à proteína G transmembrana. Eles também podem ligar tanto glicosaminoglicanos solúveis (GAGs) bem como GAGs sobre superfícies celulares as quais reforçam as concentrações locais de quimocinas, estimulando sua oligomerização e facilitando sua apresentação aos receptores. Recentemente foi demonstrado que a interação de quimocinas com 30

GAGs é necessária para sua função quimiotáctica *in vivo*.

Material e métodos

Camundongos fêmeas Balb/C de 8 a 12 semanas de idade (Janvier, França) foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 200 µl de NaCl (0,9%, livre de LPS) ou 4 µg de quimocina (WT SDF-1 α ou SDF-1 α variante de acordo com SEQ ID NO:4 diluído em 200 µl de NaCl (0,9%, livre de LPS). Em 4 pós injeções de WT ou α -mutante SDF-1, os camundongos foram sacrificados por asfixia por CO₂, a cavidade peritoneal foi lavada com 3 x 5 ml de PBS gelada e a lavagem total foi reunida para camundongos individuais. As células totais coletadas foram contadas por hemocitômetro (Neubauer, Alemanha).

Resultados

SDF-1 α injetado intraperitonealmente recruta leucócitos. Variante SDF-1 α não recruta leucócitos, mostrando que a atividade de ligação de GAG *in vivo* é perdida pela mutação no Variante SDF-1 α (vide a figura 2).

Conclusões

A variante SDF-1 α (mutante de defeituoso de ligação de GAG de SDF-1) não apresenta atividade de recrutamento de leucócitos *in vivo*.

EXEMPLO 3: Quantificação de SDF-1 α na medula espinhal na encefalomielite autoimune experimental (crônica)

Introdução

A expressão de SDF-1 α foi quantificada nas medulas espinhais dissecadas de camundongos afetados com encefalomielite autoimune experimental induzida por peptídeo MOG em fase crônica. O modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um modelo desmielinizante crônico murino e é um modelo animal estabelecido de esclerose múltipla (MS). O método usado para a indução de encefalomielite autoimune experimental em camundongos é adaptado do protocolo publicado por Sahrbacher et al. (Sahrbacher et al., 1998).

30 Material e Métodos

Amostragem da medula espinhal

Foram dissecadas medulas espinhais de camundongos sofrendo

de encefalomielite autoimune experimental 4 semanas depois do início da doença, isto é, presença de paralisia da cauda como sinal clínico. Os camundongos foram perfundidos com PBS frio e as medulas espinhas foram dissecadas em tampão de detergente triplo (50 mM de Tris, pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,02% de NaN₃, 0,1% de SDS, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sódio) contendo um coquetel inibidor de protease (Roche Molecular Biochemicals, 1836170, 1 comprimento por 10 ml de tampão). 100 µl de tampão foi usado por mg de tecido obtido. Amostras de tecido foram armazenadas em tubos eppendorf de plástico a -20°C antes de preparação através d ehomogenização e análise subsequente.

Análise do teor de SDF-1 α da medula espinhal

Medulas espinhas foram degeladas e homogeneizadas em tampão de detergente triplo usando um politron. Os níveis de proteína nas amostras foram quantificadas através do Ensaio de Teor de Proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford IL61105, EUA) antes de análise do teor de SDF-1 α usando o ELISA descrito na seção de material e métodos do Exemplo 1 acima.

Resultados

A figura 3 mostra uma hiperregulação de SDF-1 α em tecido da medula espinhal de animais com encefalomielite autoimune experimental na fase crônica da EAE.

Conclusões

A hiper-regulação da proteína SDF-1 α nos extratos da medula espinhal com EAE de fases de EAE MOG crônicas, sugere um papel para SDF-1 α em neuroinflamação diferente de recrutamento de células inflamatórias.

EXEMPLO 4: Efeito protetor de SDF-1 α sobre neuropatia induzida por compressão do nervo ciático

Introdução

O presente estudo foi realizado para avaliar a regeneração e a remielinação nervosa em camundongos tratados com SDF-1 α em diferentes doses. Um efeito positivo de SDF-1 α sobre a sobrevida e a regeneração

neuronal e axonal (neurônios sensoriais e motores), ou sobre a mielinação ou inflamação de macrófagos, pode levar à restauração da função motora. A regeneração pode ser medida de acordo com a restauração de funções sensorimotoras, as quais podem ser avaliadas por registros eletrofisiológicos.

5 Materiais e Métodos

Animais

Foram usados trinta camundongos fêmeas C57bl/6 RJ de 8 semanas de idade (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, França). Eles foram divididos em 6 grupos ($n = 6$):

- 10 (a) compressão do nervo / Veículo (Solução Salina / 0,02% de BSA);
- (b) compressão do nervo / SDF-1 α (3 μ g/kg);
- (c) compressão do nervo / SDF-1 α (10 μ g/kg);
- (d) compressão do nervo / SDF-1 α (30 μ g/kg);
- 15 (e) compressão do nervo / SDF-1 α (100 μ g/kg);
- (f) compressão do nervo / IL-6 (30 μ g /kg).

Os animais foram alojados em grupo (6 animais por gaiola) e mantidos em um ambiente com temperatura controlada (21-22°C) e um ciclo invertido de luz escuridão (12h/12h) com água e alimento disponíveis à vontade. Todos os experimentos foram realizados de acordo com orientações institucionais.

Lesão do nervo ciático

Os animais foram anestesiados por inalação de 3% de Isofluran® (Baxter). O nervo ciático direito foi exposto cirurgicamente ao nível da coxa média e comprimido em 5 mm proximal à trifurcação do nervo ciático. O nervo foi comprimido duas vezes por 30 segundos com um fórceps hemostático (largura de 1,5 mm; Koenig; Strasbourg; França) com uma rotação de 90 graus entre cada compressão.

Planejamento de experimentos e tratamento farmacológico

30 Foi realizado teste eletromiográfico (EMG) uma vez antes do dia da cirurgia e a cada semana durante 3 semanas depois da operação.

O dia da cirurgia de compressão do nervo foi considerado como

dpl 0 (dpl = dia pós-lesão). Não foi realizado nenhum teste durante os 4 dias depois da compressão.

A partir do dia da lesão do nervo até o fim do estudo, SDF-1 α , IL-6 ou Veículo foram administrados diariamente por via de injeções subcutâneas (s.c.), 5 dias por semana.

Registro eletrofisiológico

Foram realizados registros eletrofisiológicos usando um eletromiografo Neuromatic 2000M (EMG) (Dantec, Les Ulis, França). Os camundongos foram anestesiados por inalação de Isofluran® a 3% (Baxter). A temperatura corporal normal foi mantida usando uma mesa de operação aquecida (Minerve, Esternay, França).

O potencial de ação muscular do composto (CMAP) foi medido no músculo gastrocnemius depois de uma única estimulação de 0,2 ms do nervo ciático em uma intensidade supramáxima (12,8 mA). A amplitude (mV) e a latência (ms) do potencial de ação foram medidos sobre a perna operada. As medidas também foram registradas sobre a perna contralateral (não-comprimida) de animais tratados com Veículo (Linha basal). A amplitude é indicativa do número de unidades motoras ativas, enquanto a latência distal reflete indiretamente condução nervosa motora e velocidades de transmissão neuromuscular, a qual depende em parte do grau de mielinação.

Análise de dados

Análise global dos dados foi realizada usando ANOVA one-way. Foi usado teste de Dunnett adicionalmente, e os dados foram comparados com o controle de "veículo". O nível de significância foi determinado em a: p < 0,001; b ou **: p < 0,01; c ou *: p < 0,05; d: p < 0,1. Os resultados foram expressados como média ± erro-padrão da média (s.e.m.).

Medições eletrofisiológicas

Amplitude do potencial de ação muscular do composto (figura 4.A):

Não foi observada alteração significativa na amplitude do potencial de ação muscular do composto do início ao fim do estudo sobre as pernas contralaterais (não-comprimidas) de animais tratados com veículo (Linha basal). Em contraste, a compressão do nervo ciático induziu uma dramática

redução na amplitude do potencial de ação muscular do composto com uma redução no grupo tratado com Veículo de cerca de 80% em dpl7 e dpl15, quando comparado com os níveis da Linha basal respectiva. Quando camundongos foram tratados com SDF-1 α , em 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou μ/kg , ou IL-6 em 5 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, demonstraram um aumento (cerca de 1,5 vez) na amplitude do potencial de ação muscular do composto, comparados com os níveis em camundongos não-tratados, e este efeito foi significativo em 15 dpl e 22dpl.

Latência do potencial de ação muscular do composto (Fig 4.B):

Não houve deterioração da latência do potencial de ação muscular do composto sobre as pernas contralaterais (não comprimidas) de animais tratados com veículo do início ao fim do estudo. Em contraste, os músculos sobre o lado comprimido apresentaram maior latência do potencial de ação muscular do composto do que a Linha basal. Em camundongos tratados com SDF-1 α , o valor da latência do potencial de ação muscular do composto foi significativamente reduzido comparado com o valor de camundongos tratados com Veículo. No dia 7, este efeito pôde ser observado depois de tratamento com 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de SDF-1 α mas não com 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de IL-6. Em dpl 15 e 22, ainda foi obtido um efeito significativo com 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mas não com 3 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de SDF-1 α . SDF-1 α (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) é 15 mais potente do que IL-6 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$).
20

Conclusões

O modelo de compressão do nervo é um modelo muito dramático de lesão nervosa traumática e neuropatia periférica. Imediatamente depois da compressão do nervo a maioria das fibras tendo um grande diâmetro 25 são perdidas, devido à lesão mecânica, levando à forte redução na amplitude do CMAP. A latência do CMAP não é afetada imediatamente mas apresenta um aumento em 15 dias devido à degeneração adicional de fibras de pequeno diâmetro por degeneração secundária, imunomediada (macrófagos, granulócitos). A duração do CMAP está aumentada em dpl 7 e atinge o 30 pico em dpl 15.

SDF-1 α restaura a função depois de compressão do nervo periférico (latência do potencial de ação muscular do composto). Também apre-

sentou um efeito protetor no modelo de compressão do nervo em camundongos sobre todos os parâmetros medidos. Em resumo, SDF-1 α foi tão eficaz quanto a molécula de referência usada neste estudo, IL-6.

EXEMPLO 5: Efeito protetor de variante SDF-1 α sobre neuropatia induzida

5 por compressão do nervo ciático

O modelo de compressão do nervo ciático descrito no Exemplo 4 acima foi realizado para testar a variante SDF-1 α conforme definida na SEQ ID NO: 4 e os camundongos foram divididos nos 2 grupos seguintes ($n = 6$):

- (a) compressão do nervo operado / Veículo (Solução Salina / 10 0,02% de BSA);

- (b) compressão do nervo / variante SDF-1 α a 30 μ g/kg s.c.

As medidas registradas sobre a perna contralateral de animais tratados com Veículo foram consideradas como valores da Linha basal.

- A variante SDF-1 α usada neste exemplo e codificada pela SEQ 15 ID NO: 4 foi expressada com uma Metionina de N -terminal adicional. A duração do potencial de ação muscular do composto (tempo necessário para uma sessão de despolarização e uma repolarização) também foi registrada.

Resultados

Medições eletrofisiológicas

20 Amplitude do potencial de ação muscular do composto (figura 5.A):

Um aumento significativo na amplitude do potencial de ação muscular do composto foi demonstrada a 22 dpl quando os camundongos foram tratados com variante SDF-1 α .

Latência do potencial de ação muscular do composto (figura 5.B):

25 Em camundongos tratados com variante SDF-1 α , o valor de latência do potencial de ação muscular do composto foi significativamente reduzido comparado com o valor de camundongos tratados com veículo, especialmente em 7 dpl. Ainda foi obtido um efeito positivo em 22 dpl.

Duração do potencial de ação muscular do composto (figura 5.C):

30 Em camundongos tratados com variante SDF-1 α , o valor da duração do potencial de ação muscular do composto foi reduzido comparado com o valor de camundongos tratados com veículo em 7 dpl e 22 dpl

Conclusões

Foi mostrado que SDF-1 α variante restaura a função depois de compressão do nervo periférico (latência do potencial de ação muscular do composto). Também mostrou um efeito protetor no modelo de compressão
5 do nervo em camundongos sobre todos os parâmetros medidos.

EXEMPLO 6: Efeito protetor de Met-SDF-1 α sobre neuropatia induzida por compressão do nervo ciático

O modelo de compressão do nervo ciático descrito no Exemplo 4 acima foi realizado para testar Met- SDF-1 α (como definido na SEQ ID NO:
10 7) e os camundongos foram divididos nos 2 grupos seguintes (n = 6):

- (a) compressão do nervo operado / Veículo (Solução Salina / 0,02% de BSA);
- (b) compressão do nervo / variante Met-SDF-1 α em 100, 30, e 10 μ g/kg s.c.

15 As medidas registradas sobre a perna contralateral de animais tratados com Veículo foram consideradas como valores da Linha basal.

A duração do CMAP (tempo necessário para uma sessão de despolarização e uma de repolarização) também foi registrada.

Resultados

Medições eletrofisiológicas

Latência do potencial de ação muscular do composto (figura 6):

Em camundongos tratados com Met-SDF-1 α , o valor de latência do potencial de ação muscular do composto foi significativamente reduzido no dia 7 e no dia 14 depois de compressão comparados com um dos camundongos tratados com veículo.
25

Conclusões

Foi mostrado que Met-SDF-1 α restaura a função depois de compressão do nervo periférico (latência do potencial de ação muscular do composto) bem como SDF-1 α .

EXEMPLO 7: Efeito protetor de SDF-1 α na neuropatia diabética

Introdução

Neuropatia diabética é a complicação crônica mais comum do

diabetes. Os mecanismos subjacentes são múltiplos e parecem envolver várias anormalidades metabólicas inter-relacionadas consequentes à hiper-glicemia e a deficiências de insulina e de peptídeo C. A anormalidade precoce mais comum indicativa de neuropatia diabética é disfunção nervosa assintomática conforme refletido por redução da velocidade de condução nervosa (Dyck e Dyck, 1999). Estas alterações são geralmente seguidas por uma perda de sensação de vibração nos pés e perda de reflexos dos maléolos. Medições eletrofisiológicas frequentemente refletem razoavelmente acuradamente a patologia subjacente e alterações na velocidade de condução nervosa se correlacionam com mielinação de fibras nervosas (para revisão vide Sima, 1994).

O rato diabético por estreptozotocina (STZ) é o modelo animal mais extensivamente estudado de neuropatia diabética. Desenvolve uma redução aguda no fluxo sanguíneo nervoso (40%) e retardando a velocidade de condução nervosa (20%) (Cameron et al., 1991), seguida por atrofia axonal de fibras nervosas (Jakobsen, 1976). Desmielinização e degeneração de fibras mielinadas bem como disjunção axo-glial são vistas com diabetes de longa duração (Sima et al., 1988).

O objetivo primário da presente investigação foi explorar o efeito neuro- e gliaprotetor potencial de SDF-1 α sobre o desenvolvimento de neuropatia diabética em ratos-STZ.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos machos Sprague Dawley de oito semanas de idade (Janvier, Le Genest Saint Isle, França) foram distribuídos aleatoriamente em 25 6 grupos experimentais ($n = 10$) conforme mostrado abaixo.

TABELA IV

Grupo ($n = 10$)	Tratamentos	Vias de administração	Período de tratamento (dias pós-STZ)
Controle / Veículo	Veículo diariamente	s.c.	11 a 40
STZ / Veículo	Veículo diariamente	s.c.	11 a 40

Grupo (n = 10)	Tratamentos	Vias de administração	Período de tratamento (dias pós-STZ)
STZ / SDF-1 α (10 μ g/kg)	SDF-1 α diariamente	s.c.	11 a 40
STZ / SDF-1 α (30 μ g/kg)	SDF-1 α diariamente	s.c.	11 a 40
STZ / SDF-1 α (100 μ g/kg)	SDF-1 α diariamente	s.c.	11 a 40
STZ / IL-6 (10 μ g/kg)	IL-6 diariamente	s.c.	11 a 40

Eles foram alojados em grupo (3 animais por gaiola) e mantidos em um ambiente com temperatura controlada (21-22°C) e um ciclo invertido de luz escuridão (12 h / 12 h) com alimento e água disponíveis à vontade. Todos os experimentos foram realizados de acordo com orientações institucionais.

Indução de diabetes e tratamento farmacológico

Foi induzido diabetes por injeção intravenosa de uma solução tamponada de estreptozotocina (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, França) em uma dose de 55 mg/kg. STZ foi preparada em 0,1 mol/l de tampão de citrato pH 4,5. O grupo de controle recebeu um volume equivalente de tampão de citrato. O dia de injeção de STZ foi considerado como D0.

Em D10 pós-STZ, foi monitorada a glicemia para cada animal individual. Animais apresentando um valor abaixo de 260 mg/dl foram excluídos do estudo.

Tratamento com SDF-1 α , com IL-6 ou seu veículo combinado foi realizado diariamente a partir de D11 até D40.

SDF-1 α e IL-6 foram preparados em solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,02% de BSA.

Planejamento de experimentos

- Dia -7: linha basal (EMG)
- Dia 0: indução pela estreptozotocina
- Dia 7: monitoração da glicemia
- Dia 11: Início do tratamento
- Dia 20: teste de Von Frey
- Dia 25 : monitoração do EMG

- Dia 40: monitoração do EMG e teste de HP 52°C
- Dia 41: amostras de nervos ciáticos e de biópsia de pele foram colhidas para a análise histomorfométrica.

Eletromiografia

5 Registros eletrofisiológicos foram realizados usando eletromiógrafo (Keypoint, Medtronic, Boulogne-Billancourt, França). Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal (IP) de 60 mg/kg de cloridrato de quetamina (Imalgene 500®, Rhône Mérieux, Lyon, França) e 4 mg/kg de xilazina (Rompum 2%, Bayer Pharma, Kiel, Alemanha). A temperatura corporal
10 normal foi mantida a 30°C com uma lâmpada de calefação e controlada por um termômetro de contato (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, França) colocado sobre a superfície da cauda.

O potencial de ação muscular do composto (CMAP) foi registrado no músculo gastrocnemius depois de estimulação do nervo ciático. Um
15 eletrodo de referência e uma agulha ativa foram colocados na pata traseira. Uma agulha terra foi inserida no dorso inferior do rato. O nervo ciático foi estimulado com um único pulso de 0,2 ms em uma intensidade supramáxima. A velocidade da onda motora foi registrada.

A velocidade de condução nervosa sensorial (SNCV) também foi
20 registrada. Os eletrodos da pele da cauda foram colocados como se segue: uma agulha de referência inserida na base da cauda e uma agulha de anodo colocada 30 mm distante da agulha de referência em direção à extremidade da cauda. Um eletrodo da agulha terra foi inserido entre o anodo e as agulhas de referência. O nervo caudal foi estimulado com uma série de
25 20 pulsos (por 0,2 ms) em uma intensidade de 12,8 mA. A velocidade foi expressada em m/s.

Análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada ao fim do estudo. Os animais foram anestesiados por injeção IP de 60 mg/kg de Imalgène 500®. Um
30 segmento de nervo ciático de 5 mm foi excisado para histologia. O tecido foi fixado de um dia para o outro com 4% de solução de glutaraldeído (Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, França) em solução tampão de fosfato (pH 7,4) e

mantido em 30% de sucrose a +4°C até o uso. A amostra de nervo foi fixada em 2% de solução de tetróxido de ósmio (Sigma) em solução tampão de fosfato por 2 horas, desidratada em solução alcoólica serial, e embutida em Epon. Tecidos embutidos foram em seguida colocados a +70°C durante

5 3 dias de polimerização. Seções transversas de 1,5 µm de espessura foram obtidas usando um micrótomo. As seções foram coradas com uma solução a 1% de azul de toluidina (Sigma) por 2 min, desidratadas e montadas em Eu-kitt.

Foi realizada análise sobre toda a superfície da seção de nervos
10 usando um software de análise de imagem digital semiautomatizado (Biocom, França). Uma vez que objetos estranhos tinham sido eliminados, o software reportou o número total de fibras mielinadas. O número de fibras degeneradas foi em seguida contado manualmente por um operador. Fibras mielinadas sem axônios, mielina redundante e fibras apresentando bainhas
15 com espessura larga demais em relação a seu diâmetro axonal foram consideradas como fibras sofrendo processos de degeneração. O número de fibras não degeneradas foi obtida por subtração do número de fibras degeneradas.

Análise morfológica foi realizada somente sobre fibras consideradas como não degeneradas. Para cada fibra, as medidas axonais e da mielina foram reportadas em área superficial (μm^2). Estes dois parâmetros foram usados para calcular a área equivalente de proporção g (diâmetro axonal / diâmetro da fibra) de cada fibra (i.e., $[A/(A+M)]^{0.5}$, A = área axonal, M = área de mielina), indicativa da espessura relativa da bainha de mielina.

25 Além disso, uma área de pele de 5 a 10 mm de diâmetro foi biopsiada por punção da pata traseira. Amostras de pele foram imediatamente fixadas de um dia para o outro em paraformaldeído a 4°C, incubadas (de um dia para o outro) em 30% de sacarose em 0,1 M de PBS para crioproteção, embutidas em OCT e congeladas a -80°C até criocorte.

30 Ciosseções de 50 µm de espessura foram em seguida cortadas verticais à superfície da pele com um criostato. Seções de livre flutuação foram incubadas por 7 dias em um banho de produto genético antiproteína

de coelho 9.5 (1:10000; Ultraclone, Isle of Man, Reino Unido) a 4°C. As seções foram em seguida processadas para revelar imunorreatividade de acordo com o método da ABC peroxidase. Em resumo, elas foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-cabra biotinilado (1:200), em seguida 30 min no complexo biotinilado com avidina em temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi visualizada usando o sistema DAB. As seções foram em seguida contracoradas com eosina ou hematoxilina. As seções foram desidratadas, limpas com bioclear e montadas sobre eukitt. Fotos de campos microscópicos foram realizadas em vista de ampliação de 20x de potência 10 usando câmera digital Nikon em distância focal de 12,9 mm. O número de nervos intraepidérmicos sobre 3 campos microscópicos de $0,22 \mu\text{m}^2$ ($544 \times 408 \mu\text{m}$) cada foi contado pelo experimentador na tela do computador.

Análise de dados

15 Análise global dos dados foi realizada usando um fator ou análise de medida repetida da variância (ANOVA) e ANOVA one-way. Quando ANOVA indicou diferença significativa, Diferença Menos Significante Protegida de Fisher foi usada como teste post-hoc para comparar grupos experimentais com o grupo de ratos diabéticos tratados com o veículo. O nível de 20 significância foi determinado em $p \leq 0,05$. Os resultados são expressados como média \pm erro padrão da média (s.e.m.).

Resultados

Peso corporal

Em contraste com ratos não-diabéticos apresentando um crescimento progressivo, ratos diabéticos demonstraram uma importante parada 25 do crescimento (Figura 7A).

Tratamento com SDF-1 α ou com IL-6 foi associado a aumento ligeiro mas significativo no peso corporal de ratos diabéticos tratados com veículo.

30 Glicemia

No dia 7 pós-STZ, todos os ratos que receberam STZ apresentaram glicemia 5 vezes maior do que os ratos de controle (Figura 7B).

Medições eletrofisiológicas

1. Latência para potencial de ação muscular do composto

A latência do potencial de ação muscular do composto foi significativamente prolongada em ratos diabéticos em D25 comparada com a de 5 ratos não-diabéticos (figura 7C). Tratamento com SDF-1 α ou com IL-6 induziu uma redução significativa na latência do potencial de ação muscular do composto de ratos diabéticos comparada com a de ratos diabéticos tratados com veículo.

Perfil similar de resultados foi observado em D40 pós-STZ.

10 2. Velocidade de condução nervosa sensorial

Em D25, ratos diabéticos tratados com veículo demonstraram uma velocidade de condução nervosa sensorial significativamente reduzida comparados com ratos não-diabéticos (Figura 7D). Tratamento com SDF-1 α ou com IL-6 melhorou significativamente a performance da velocidade de 15 condução nervosa sensorial de ratos diabéticos. O melhor efeito foi observado com as doses de tratamento de 10 e 30 μ g/kg e foi comparável com o efeito associado a tratamento com IL-6.

Perfil similar de resultados foi observado em D40 pós-STZ.

Análise morfométrica

20 1. proporção g (espessura de mielina relativa)

A proporção g de ratos diabéticos recebendo veículo foi significativamente aumentada comparada com a de ratos não diabéticos (Figura 7E), sugerindo um adelgaçamento da bainha de mielina em ratos diabéticos. O tratamento de ratos diabéticos com SDF-1 α reduziu significativamente a proporção g comparados com grupo tratado com STZ / Veículo, especialmente para as doses de 10 ou 30 μ g/kg. Na dose de 100 μ g/kg, a redução no valor da proporção g não atingiu o nível de significância.

Tratamento com IL-6 também induziu uma redução significativa no valor da proporção g.

30 2. Número de Fibras degeneradas

Ratos diabéticos recebendo veículo apresentaram proporção significativamente maior de fibras degeneradas do que ratos não-diabéticos

(figura 7F). Ao invés, a proporção de fibras não-degeneradas em ratos diabéticos foi significativamente reduzida comparada com a de ratos não-diabéticos (figura 7F). O tratamento de ratos diabéticos com SDF-1 α apresentou redução de população de fibras degeneradas. O melhor efeito foi associado com a menor dose implementada (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e atingiu o nível de significância.

Uma população de fibras degeneradas significativamente reduzidas também foi observada em ratos diabéticos tratados com IL-6.

Conforme mostrado na Figura 7G, ratos diabéticos recebendo veículo apresentaram densidade de fibras nervosas intra-epidermais significativamente reduzida comparados com ratos não diabéticos. O tratamento de ratos diabéticos com SDF-1 α foi associado à densidade significativamente maior de fibras nervosas dérmicas do que tratamento com o veículo. O efeito observado foi comparável com o induzido por tratamento com IL-6.

15 Conclusões

No presente estudo, é desejado avaliar o efeito neuro- e gliaprotetor de SDF-1 α sobre o desenvolvimento de neuropatia relacionada a diabetes. Foram conduzidas investigações sobre neuropatia relacionada a diabetes induzida por STZ no rato. Similarmente à situação clínica de neuropatia diabética, uma condução nervosa sensorial prejudicada detectada tão cedo quanto no dia 7 pós-STZ é o primeiro sinal para indicar neuropatia existente neste modelo, a qual está de acordo com evidências de desmielinação e/ou degeneração axonal observadas nos momentos posteriores (Andriambeloson et al., 2006). Um estudo prévio demonstrou que o tratamento de STZ-ratos com baixa dose de IL-6 impediu a progressão de neuropatia neste modelo sem interferir com o desenvolvimento de glicemia (Andriambeloson et al., 2006).

No presente estudo, descobriu-se que a administração crônica de SDF-1 α (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) melhora o desempenho sensorimotor de ratos diabéticos (escores de latência da velocidade de condução nervosa sensorial e do potencial de ação muscular do composto) dentro de cerca de 2 semanas de tratamento. O melhor efeito foi obtido com a dose de trata-

mento de 10 ou 30 µg/kg, apresentando eficiência comparável a 10 µg/kg de IL-6. ALém disso, foi visto que tratamento com SDF-1 α nestas doses previne acentuadamente a perda de mielina associada com este modelo. Como a qualidade da bainha de mielina é um importante componente para ótimal
5 condução nervosa, a conservação do tamanho da bainha de mielina pode, de fato, explicar em parte a melhora na função nervosa de ratos diabéticos recebendo tratamento com SDF-1 α . Além disso, também foi observado que SDF-1 α reduz a população de fibras sofrendo degeneração axonal no nervo ciático.

10 Similarmente à situação clínica de neuropatia diabética apresentando correlação entre a presença e a gravidade de neuropatia e degeneração de fibras nervosas intra-epidérmicas de biópsia da pele (Herrmann et al., 1999; Smith et al., 2001), neuropatia diabética em ratos induzida por STZ também demonstra que sinais clínicos de neuropatia neste modelo animal foi
15 fortemente correlacionada com a redução na densidade de fibras nervosas intraepidérmicas. De acordo com os achados acima, o presente estudo mostrou que ratos diabéticos tratados com veículo demonstram importante redução na densidade de fibras nervosas intraepidérmicas. Este fenômeno foi prevenido acentuadamente pelo tratamento com SDF-1 α ou com IL-6 e portanto adicionalmente corroborando o efeito neuroprotetor de SDF-1 α com respeito à lesão de nervos induzida por diabetes.
20

Conjuntamente, os achados acima indicam efeito neuroprotetor de tratamento com SDF-1 α no modelo de neuropatia diabética de rato. SDF-1 α é um candidato interessante no desenvolvimento de terapia de tratamento para neuropatia diabética clínica.
25

EXEMPLO 8 : Efeito protetor de SDF-1 α na dor neuropática

Introdução

A causa precipitante mais comum de dor neuropática é diabetes particularmente onde o controle da glicose sanguínea é insatisfatório. Aproximadamente 2 a 24% dos pacientes com diabetes experimentam dor neuropática. A dor neuropática diabética pode ocorrer ou espontaneamente, como um resultado da exposição a estímulos normalmente moderadamente

dolorosos (isto é, Hiperalgesia), ou a estímulos que não são normalmente percebidos como sendo dolorosos (isto é, Alodinia). Uma série de anomalias na percepção de dor foram demonstradas no modelo da estreptozotocina (Hounsom e Tomlinson, 1997) no estágio inicial do diabetes. Por exemplo, 5 retração provocada por formalina é exagerado em ratos tratados com STZ comparados com animais controle. Além disso, o desenvolvimento de alodinia tátil foi reportado neste modelo animal de diabetes (Calcutt et al., 1995, 1996). No último estágio quando persiste a hiperglicemia (Bianchi et al., 2004), a extensão do limiar de placa quente foi reportada como anormalida- 10 de comportamental em ratos diabéticos.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Sprague Dawley machos de oito semanas de idade (Janvier, Le Genest Saint Isle, França) foram distribuídos aleatoriamente em 15 6 grupos experimentais ($n = 10$) conforme mostrado abaixo.

TABELA V

Grupo ($n = 10$)	Tratamentos	Vias de ad-ministração	Período de tra-tamento (dias pós-STZ)
Controle / Veículo	Veículo diariamente	s.c.	11 a 40
STZ/Veículo	Veículo diariamente	s.c.	11 a 40
STZ/SDF-1 α (10 μ g/kg)	SDF-1 α diariamente	s.c.	11 a 40
STZ/SDF-1 α (30 μ g/kg)	SDF-1 α diariamente	s.c.	11 a 40
STZ/SDF-1 α (100 μ g/kg)	SDF-1 α diariamente	s.c.	11 a 40
STZ / IL-6 (10 μ g/kg)	IL-6 diariamente	s.c.	11 a 40

Eles foram alojados em grupo (3 animais por gaiola) e mantidos em um ambiente com temperatura controlada (21-22°C) e um ciclo invertido de luz / escuridão (12h/12h) com água e alimento disponíveis à vontade. To- 20 dos os experimentos foram realizados de acordo com orientações institucionais.

Indução de diabetes e tratamento farmacológico

Diabetes foi induzido por injeção intravenosa de uma solução

tamponada de estreptozotocina (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, França) em uma dose de 55 mg/kg. STZ foi preparada em 0,1 mol/l de tampão de citrato pH 4,5. O grupo controle recebeu um volume equivalente de tampão de citrato. O dia da injeção de STZ foi considerado como D0.

5 No D10 pós-STZ, foi monitorada a glicemia para cada animal individual. Animais apresentando um valor abaixo de 260 mg/dl foram excluídos do estudo.

Tratamento com SDF-1 α , com IL-6 ou seu veículo combinado foi realizado em base diária a partir de D11 até D40.

10 SDF-1 α e IL-6 foram preparados em solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,02% de BSA.

Planejamento dos experimentos

- Dia 0: indução pela estreptozotocina

- Dia 7: monitoração da glicemia

15 - Dia 11: Início do tratamento

- Dia 20: teste de Von Frey

- Dia 40: monitoração do EMG e teste de placa quente a 52°C

Teste do filamento de Von Frey

O rato foi colocado sobre um piso de grade metálica. O teste nociceptivo foi feito inserindo o filamento de Von Frey (Bioseb, França) através do piso de grade e aplicando este na superfície plantar da pata traseira. Uma prova consistiu em várias aplicações dos diferentes filamentos de von Frey (em uma frequência de 1 a 1,5 s). Os filamentos de Von Frey foram aplicados a partir do filamento de 10 g até 180 g. A pressão que produz uma retirada brusca da pata traseira foi considerada como valor-limite. O valor de corte foi determinado para 180 g.

Teste de placa quente a 52°C

O animal foi colocado dentro de um cilindro de vidro sobre uma placa quente ajustada para 52°C. A latência da primeira reação foi registrada (lambida, movimento brusco das patas, pequenos saltos ou um salto para fugir do calor) com um tempo de corte de 30 s.

Resultados

Filamento de Von Frey

No dia 20 pós-STZ, ratos diabéticos tratados com veículo apresentaram limiar significativamente menor no teste de Von Frey do que ratos não-diabéticos (figura 8A).

5 O tratamento com SDF-1 α ou com IL-6 induziu um aumento significativo no valor limite de ratos diabéticos comparado com o escore de ratos diabéticos tratados com veículo. Os valores limites de ratos tratados com SDF-1 α ou IL-6 não foram estatisticamente diferentes dos de ratos não-diabéticos.

10 Teste de placa quente a 52°C

Em D40 pós-STZ, ratos diabéticos recebendo tratamento com veículo demonstraram limiar de latência significativamente maior no teste de placa quente comparados com ratos não diabéticos (figura 8B).

15 O tratamento de ratos diabéticos com SDF-1 α ou com IL-6 reduziu significativamente o limiar de latência de ratos diabéticos para um nível estatisticamente comparável com o de ratos não-diabéticos.

Conclusões

Foram avaliados os comportamentos de ratos em resposta a filamento de Von Frey (estimulação mecânica) e a calor (52°C), em D20 e 20 D40, respectivamente. Nestes dois testes, ratos diabéticos tratados com SDF-1 α obviamente apresentaram diferença de comportamento comparados com os ratos tratados com o veículo e seu escore se tornou comparável com o de ratos não-diabéticos.

25 Estes resultados parecem estar de acordo com os achados eletrofisiológicos e histológicos e sugerem que SDF-1 α também pode ser protetor na dor neuropática.

EXEMPLO 9: Associação genética entre gene SDF-1 e MS progressiva primária

Materiais e Métodos

30 Conjuntos de pacientes e controles

O estudo compreendeu um conjunto de pacientes não relacionados à MS progressiva primária (MSPP). Todos os indivíduos no estudo

eram Caucasianos da Itália. Pacientes e controles da Sardenha foram descartados.

Foram incluídos 197 pacientes com curso progressivo. 141 tiveram uma progressão de sintomas neurológicos a partir do início da doença, 5 sem recaídas (Progressiva Primária); 39 tiveram um curso progressivo com recaídas sobrepostas (Recorrente Progressiva); 17 tiveram um curso progressivo iniciando muitos anos depois de um ataque isolado (Progressiva de Único ataque). A população de controle compreendeu 234 controles saudáveis não relacionados dos mesmos antecedentes étnicos que a população 10 do caso.

O grupo de casos teve uma proporção sexual de 1,05 (101 Fêmeas e 96 Machos) e uma idade média no início de 39,2 [19-65] anos. O grupo de controles incluiu 234 indivíduos, com uma proporção sexual de 1,03 (119 Fêmeas e 115 Machos) e uma idade média de 40,4 [19-70] 15 anos.

GENOTIPAGEM

Métodos para análise de Genoma Inteiro: método Affymetrix

250 ng (5 µl) de DNA de cada amostra foi digerido em paralelo com 10 unidades de enzimas de restrição Nsp I e Sty I (New England Bio-labs, Beverly, MA) por 2 horas a 37°C. Oligonucleotídeos adaptadores específicos de enzimas foram em seguida ligados sobre as extremidades digeridas com T4 DNA Ligase por três horas a 16°C. Depois de diluição com água, 5 µl das reações de ligação diluída foram submetidos a PCR. PCR foi realizada com Titanium Taq DNA Polymerase (BD Biosciences, San Jose, 25 CA) na presença de 25 µM de iniciador de PCR 002 (Affymetrix), 350 µM cada dNTP, Betaína a 1 M (USB, Cleveland, OH), e tampão 1X Titânio Taq PCR (BD Biosciences). Os parâmetros de ciclagem foram como se segue, desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, amplificação a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 15 segundos repetida 30 um total de 30 vezes, extensão final a 68°C por 7 minutos. Produtos de PCR das três reações foram combinados e purificados com as placas de purificação por UF PCR de 96 cavidades MinElute (Qiagen, Valencia, CA) de acor-

do com as instruções do fabricante. As amostras foram coletadas em tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos.

O produto purificado foi recuperado do tubo tomando cuidado especial para não agitar o pélete branco semelhante a gel de fosfato de magnésio. Em seguida, foram verificados produtos de PCR que migram em um tamanho médio entre 200 e 800 bps usando eletroforese por gel TAE a 2%. Sessenta microgramas de produtos de PCR purificados foram em seguida fragmentados usando 0,25 unidade de DNase I a 37°C por 35 minutos. Completa fragmentação dos produtos para um tamanho médio de menos de 180 bps foi verificada usando eletroforese por gel TAE a 2%. Depois de fragmentação, o DNA foi marcado na extremidade com 105 unidades de desoxinucleotidil transferase terminal a 37°C por 2 horas. O DNA marcado foi em seguida hibridizado sobre o ensaio Mendel respectivo a 49°C por 18 horas a 60 rpm. O ensaio hibridizado foi lavado, corado, e escaneado de acordo com as instruções do fabricante (Affymetrix).

Foram obtidas análises de genótipo usando o algoritmo DM em um Valor de p de 0,33 seguido por uma análise em série usando o algoritmo BRLMM seguindo especificações da Affymetrix.

Filtragem de SNP

- SNPs foram filtrados com os seguintes critérios:
- O índice de genótipos ausente deve ser < 5%
 - A Frequência de Alelo Mínima (MAF) deve ser > 1% nos controles
 - A probabilidade não estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg deve ser < 2% nos controles
 - O SNP deve ser polimórfico nos casos

Somente SNPs de cromossomas autossômicos foram mantidos para análise

Análise Estatística

Método:

- O FDR (falso índice de descoberta) foi estimado com 10.000 permutações com os seguintes testes univariados (usando testes exatos com estatística de Pearson) para cada população:

- Teste alélico
- Teste genotípico
- Mínimo de teste alélico e genotípico (abreviado 'min')
- Máximo de teste alélico e genotípico (abreviado 'max')

5 Resultados

Filtragem de SNP e cobertura genômica

Aplicando os filtros definidos acima reduziu o número de SNPs remanescentes conforme mostrado na Tabela VI:

TABELA VI

Varredura	no. total de SNPs	no. de SNPs de- pois de filtragem	% remanes- cente
casos de MSPP vs. controles de MS	497.641	323.664	65 %

10 **FDR**

Os resultados de FDR são mostrados na figura 9

Em um limiar de FDR de 10%, os SNPs e genes foram selecionados conforme mostrado na Tabela VII.

TABELA VII

Varredura	no. de SNPs	no. de BINs	no. de genes	no. de recom- pensas
MSPP vs controles	78	72	62	10

15 Um SNP (SNP_A-2185631) foi selecionado no gene SDF-1 (CXCL2) (vide a figura 10.)

Olhando as tabelas de contingência, pode-se ver que a associação vem da distribuição diferencial do alelo C nas populações de casos e controle.

20

TABELA VIII

Genótipos	MSPP vs controles	
	casos	Controles
CC	2,2%	0,0%
CG	22,8%	7,4%
GG	75,0%	92,6%

Uma bioanálise detalhada da região em torno deste SNP mostra que está localizado em um ítron de novas isoformas de SDF-1 descobertas recentemente, conforme descrito a seguir:

De acordo com Ensembl, o qual somente identificou as duas isoformas SDF-1 alfa e SDF-1 beta, SNP_A-2185631 está localizado 25 kb a jusante do gene SDF-1 (também conhecido como CXCL12). Nenhum gene está localizado mais próximo a SNP_A-2185631.

SDF-1 está localizado sobre o cromossoma 10 (44,192,517-44,200,551, NCBI estrutura 35) e spans 8 kb.

Uma anotação da sequência genômica foi realizada de modo a saber se o SNP_A-2185631 pode ser relacionado com o gene SDF-1 ou com outro gene adjacente.

Em bancos de dados de sequências, foram descobertas variantes de junção não descritas em Ensembl: SDF-1 gama, SDF-1 delta, SDF-1 epsilon e SDF-1 fi. Todas as variantes de junção têm os mesmos primeiros 3 éxons. O último éxon de SDF-1 epsilon e SDF-1 fi estão localizados 72 kb a jusante (vide a figura 11). Estas novas sequências foram submetidas ao NCBI em junho de 2006 pelos "Lilly Research Laboratories, Cardiovascular Division, Cancer Division and Integrative Biology, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285, EUA". Os cDNA (DQ345520 e DQ345519) codificando estas duas isoformas contêm sítios de junção canônicos, um sinal de poliadeniilação e uma cauda polyA (não encontrados sobre a sequência genômica).

Como todas as variantes de junção têm os mesmos primeiros três éxons, as 6 isoformas têm a mesma parte N-ter (88 aminoácidos).

Portanto, uma bioanálise detalhada da região em torno de SNP_A-2185631 mostrou que:

- o gene SDF-1 é mais longo do que esperado: 87 kb ao invés de 8kb

- o SNP de interesse (SNP_A-2185631) está no gene SDF-1, localizado no último ítron de SDF-1 epsilon e SDF-1 fi (vide a figura 12).

Portanto se concluiu que o gene SDF-1 está associado com esclerose múltipla progressiva primária.

Listagem de Referências

1. Andriambeloson, E., Baillet,C., Vitte, P.A., Garotta, G., Drea-no,M., Callizot, N. (2006) Interleukin-6 attenuates the development of expe-rimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology*. 26, 32-42.
- 5 2. Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., e Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
3. Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., e Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new ge-neration of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-10 3402.
4. Amara,A., Lorthioir,O., Valenzuela,A., Magerus,A., Thelen,M., Montes,M., Virelizier,J.L., Delepierre,M., Baleux,F., Lortat-Jacob,H., e Aren-zana-Seisdedos,F. (1999). Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem* 15 274, 23916-23925.
5. Ambrosini,E., Remoli,M.E., Giacomini,E., Rosicarelli,B., Sera-finii,B., Lande,R., Aloisi,F., e Coccia,E.M. (2005). Astrocytes produce dendri-tic cell-attracting chemokines *in vitro* and in multiple sclerosis lesions. *J Neu-ropathol. Exp Neurol.* 64, 706-715.
- 20 6. Bajetto,A., Bonavia,R., Barbero,S., Florio,T., e Schettini,G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 22, 147-184.
7. Bezzi,P., Domercq,M., Brambilla,L., Galli,R., Schols,D., De Clercq,E., Vescovi,A., Bagetta,G., Kollias,G., Meldolesi,J., e Volterra,A. 25 (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplifi-cation by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4, 702-710.
8. Bianchi, R., Buyukakilli, B., Brines, M., Savino, C., Cavaletti, G., Oggioni, N., Lauria, G., Borgna, M., Lombardi, R., Cimen, B., Comelekoglu, U., Kanik, A., Tataroglu, C., Cerami, A., Ghezzi, P. (2004) Erythropoietin 30 both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101,823-828.
9. Botstein,J.E. e Sato,G.H. (1979). Growth of a rat neuro-

- blastoma cell line in serum-free supplemented medium. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 514-517.
10. Calcutt, N.A., Jorge, M.C., Yaksh ,T.L., Chaplan, S.R. (1996) Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine Pain 68 , 293-9.
 - 5 11. Calcutt N.A., Li L, Yaksh, T.L., Malmberg, A.B. (1995) Different effects of two aldose reductase inhibitors on nociception and prostaglandin E. Eur. J. Pharmacol. 285 ,189-197.
 - 10 12. Cameron N.E., Cotter M.A., Low P.A. (1991) Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. Am. J. Physiol 261, E1-8.
 13. Consilvio,C., Vincent,A.M., e Feldman,E.L. (2004). Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? Exp Neurol. 187, 1-10.
 - 15 14. Devereux,J., Haeberli,P., and Smithies,O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 12, 387-395.
 - 15 15. Dyck, P.J.B., Dyck, P.J. (1999) Diabetic polyneuropathy. In Diabetic Neuropathy, Dyck PJ, Thomas PK (eds). Saunders WB: Philadelphia, PA, 255-278.
 - 20 16. Eikelenboom,P., Bate,C., Van Gool,W.A., Hoozemans,J.J., Rozemuller,J.M., Veerhuis,R., e Williams,A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. Glia 40, 232-239.
 - 25 17. Gao,H.M., Liu,B., Zhang,W., e Hong,J.S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease . Trends Pharmacol Sci 24, 395-401.
 18. Gleichmann,M., Gillen,C., Czardybon,M., Bosse,F., Greiner-Petter,R., Auer,J., e Muller,H.W. (2000). Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. Eur J Neurosci 12, 1857-1866.
 - 30 19. Grantham,R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution. Science 185, 862-864.
 20. Hesselgesser,J., Taub,D., Baskar,P., Greenberg,M., Hoxi-

- e.J., Kolson,D.L., e Horuk,R. (1998). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr Biol* 8, 595-598.
21. Hoogewerf,A.J., Kuschert,G.S., Proudfoot,A.E., Borlat,F., Clark-Lewis,I., Power,C.A. , e Wells,T.N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 36, 13570-13578.
- 5 22. Hunter,C.L., Bachman,D., e Granholm,A.C. (2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 56, 675-688.
- 10 23. Infante,J., Llorca,J., Berciano,J., e Combarros,O. (2005). Interleukin-8, intercellular adhesion molecule-1 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and the risk for multiple system atrophy. *J Neurol. Sci* 228, 11-13.
- 15 24. Jakobsen, J. (1976) Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia* 12, 547-553.
- 25 25. Jiang,Y., Salafranca,M.N., Adhikari,S., Xia,Y., Feng,L., Sonntag,M.K., deFiebre,C.M., Pennell,N.A., Streit,W.J., e Harrison,J.K. (1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 86, 1-12.
- 20 26. Lazarini,F., Tham,T.N., Casanova,P., Arenzana-Seisdedos,F., e Dubois-Dalcq,M. (2003). Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 42, 139-148.
- 25 27. Lehnardt,S., Lachance,C., Patrizi,S., Lefebvre,S., Follett,P.L., Jensen,F.E., Rosenberg,P.A., Volpe,J.J., e Vartanian,T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the SNC. *J Neurosci* 22, 2478-2486.
- 30 28. Lehnardt,S., Massillon,L., Follett,P., Jensen,F.E., Ratan,R., Rosenberg,P.A., Volpe,J.J., and Vartanian,T. (2003). Activation of innate immunity in the SNC triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8514-8519.

29. Ma,Q., Jones,D., Borghesani,P.R., Segal,R.A., Nagasawa,T., Kishimoto,T., Bronson,R.T., e Springer,T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 9448-9453.
- 5 30. Noseworthy,J.H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. Nature 399, A40-A47.
31. Panenka,W., Jijon,H., Herx,L.M., Armstrong,J.N., Feighan,D., Wei,T., Yong,V.W., Ransohoff,R.M., e MacVicar,B.A. (2001). P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. J Neurosci 21, 7135-7142.
- 10 32. Pearson,W.R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. Methods Enzymol. 183, 63-98.
33. Pearson,W.R. e Lipman,D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85, 2444-2448.
- 15 34. Perry,V.H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. Brain Behav. Immun. 18, 407-413.
35. Phizicky,E.M. e Fields,S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol. Rev 59, 94-123.
- 20 36. Robinson,S., Tani,M., Strieter,R.M., Ransohoff,R.M., e Miller,R.H. (1998). The chemokine growth-regulated oncogene-alpha promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. J Neurosci 18, 10457-10463.
- 25 37. Rovaris, M., Judica, E., Gallo,A., Benedettim B., Sormani, M.P., Caputo, D., Ghezzi, A., Montanari, E., Bertollootto, A., Mancardi, G., Bergamaschi, R., Mrtinelli, V., Comi, G., Filippi, M. (2006) Grey matter damage predicts the evolution of primary progressive multiple sclerosis at 5 years. Brain , August 18, 1-7.
- 30 38. Sadir,R., Baleux,F., Grosdidier,A., Imbert,A., e Lortat-Jacob,H. (2001). Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. J Biol Chem 276, 8288-8296.

39. Sahrbacher,U.C., Lechner,F., Eugster,H.P., Frei,K., Lassmann,H., e Fontana,A. (1998). Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 28, 1332-1338.
- 5 40. Schwarz,M.K. e Wells,T.N. (1999). Interfering with chemokine networks--the hope for new therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 3, 407-417.
- 10 41. Sima, A. A., Nathaniel, V., Bril V., McEwen T.A., Greene D.A. (1988) Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-glial dysjunction in human diabetic neuropathy. *J. Clin. Invest* 81, 349-364.
42. Sima A.A. (1994) Pathological definition and evaluation of diabetic neuropathy and clinical correlations. *Can. J. Neurol. Sci.* 21,S13-17.
- 15 43. Smith,T.F. e Waterman,M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.
- 20 44. Sorensen,T.L., Trebst,C., Kivisakk,P., Klaege,K.L., Majmudar,A., Ravid,R., Lassmann,H., Olsen,D.B., Strieter,R.M., Ransohoff,R.M., e Sellebjerg,F. (2002). Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol.* 127, 59-68.
45. Stoll,G., Jander,S., e Myers,R.R. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher. Nerv. Syst.* 7, 13-27.
- 25 46. Stumm,R.K., Rummel,J., Junker,V., Culmsee,C., Pfeiffer,M., Kriegstein,J., Hollt,V., e Schulz,S. (2002). A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci* 22, 5865-5878.
- 30 47. Tuppo,E.E. e Arias,H.R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J Biochem Cell Biol* 37, 289-305.
48. Yu, L. et al (2006), Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1.

49. Zhu,Y., Yu,T. , Zhang,X.C., Nagasawa,T., Wu,J.Y., e Rao,Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci* 5, 719-720.
50. Zou,Y.R., Kottmann,A.H., Kuroda,M., Taniuchi,I., e Littman,D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haemopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.
51. Zujovic,V., Benavides,J., Vige,X., Carter,C., e Taupin,V. (2000). Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 29, 305-315.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de SDF-1 ou um agonista de atividade de SDF-1, caracterizado pelo fato de que é fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica.

5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é SDF-1 é SDF-1 α .

 3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é SDF-1 é uma variante SDF-1 α .

10 4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença neurológica está associada à inflamação.

 5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a inflamação é neuroinflamação.

15 6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a doença neurológica é selecionada entre o grupo consistindo em lesão nervosa traumática, derrame, doenças desmielinizantes do SNC ou do SNP, neuropatias.

 7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a doença neurológica é uma neuropatia periférica.

20 8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a neuropatia periférica é neuropatia diabética ou dor neuropática.

 9. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a lesão nervosa traumática compreende trauma de um nervo periférico.

25 10. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a lesão nervosa traumática compreende trauma da medula espinhal.

 11. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a doença desmielinizante é esclerose múltipla (MS).

30 12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a doença desmielinizante é esclerose múltipla progressiva primária (MS) ou esclerose múltipla progressiva secundária (MS).

 13. Uso de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato

de que a doença desmielinizante é selecionada entre esclerose múltipla inflamatória crônica, polineuropatia desmielinizante (CIDP) e síndrome de Guillain-Barré (GBS).

14. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13,
5 caracterizado pelo fato de que SDF-1 é selecionada entre o grupo consistindo em:
- (a) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 1
 - (b) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 4
 - 10 (c) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 7
 - (d) um polipeptídeo de (a) a (c) compreendendo adicionalmente uma sequência de sinal, preferencialmente aminoácidos de SEQ ID NO: 5
 - 15 (e) uma mutéína de qualquer um de (a) a (d), em que a sequência de aminoácidos tem pelo menos 40 % ou 50 % ou 60 % ou 70 % ou 80 % ou 90 % de identidade com pelo menos uma das sequências em (a) a (c);
 - (f) uma mutéína de qualquer um de (a) a (d) a qual é codificada por uma sequência de DNA a qual hibridiza ao complemento da sequência de DNA nativa codificando qualquer um de (a) a (c) sob condições altamente estringentes;
 - 20 (g) uma mutéína de qualquer um de (a) a (d) em que quaisquer alterações na sequência de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservativas para as sequências de aminoácidos em (a) a (c);
 - 25 (h) um sal ou uma isoforma, proteína fundida, derivado funcional, ou fração ativa de qualquer um de (a) a (d).

15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14,
caracterizado pelo fato de que SDF-1 é fundido a uma molécula de veículo,
um peptídeo ou uma proteína que estimula o cruzamento da barreira san-
30 guínea cerebral.

16. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15,
caracterizado pelo fato de que o SDF-1 é PEGuilado.

17. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a proteína fundida compreende uma fusão de imunoglobulina (Ig).

18. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, 5 caracterizado pelo fato de que o medicamento compreende adicionalmente um interferon e/ou osteopontina e/ou clusterina, para uso simultâneo, sequencial, ou separado.

19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o interferon é β -interferon.

10 20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o SDF-1 é usado em uma quantidade de cerca de 0,001 a 1 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal ou cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mg/kg de peso corporal ou cerca de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

15 21. Uso de uma molécula de ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de ácido nucléico de SEQ ID NO: 6 ou uma sequência de ácido nucléico codificando um polipeptídeo compreendendo 20 uma sequência de aminoácidos selecionada entre o grupo consistindo em:

- (a) polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 1
- (b) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 4
- (c) um polipeptídeo compreendendo aminoácidos de SEQ ID NO: 7
- (d) um polipeptídeo de (a) a (c) compreendendo adicionalmente uma sequência de sinal, preferencialmente aminoácidos de SEQ ID NO: 5
- (e) uma mureína de qualquer um de (a) a (d), em que a sequência de aminoácidos tem pelo menos 40 % ou 50 % ou 60 % ou 70 % ou 80 % ou 90 % de identidade com pelo menos uma das sequências em (a) a (c);
- (f) uma mureína de qualquer um de (a) a (d) a qual é codificada por uma sequência de DNA a qual hibridiza ao complemento da sequência

de DNA nativa codificando qualquer um de (a) a (c) sob condições altamente estringentes;

(g) uma mutoína de qualquer um de (a) a (d) em que quaisquer alterações na sequência de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservativas para as sequências de aminoácidos em (a) a (c);

(h) um sal ou uma isoforma, proteína fundida, derivado funcional, ou fração ativa de qualquer um de (a) a (d).

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico compreende adicionalmente uma sequência de vetor de expressão.

23. Uso de um vetor para induzir e/ou reforçar a produção endógena de SDF-1, ou um agonista de atividade de SDF-1, em uma célula, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica.

15 24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que é para terapia genética.

25 25. Uso de uma célula que tenha sido modificada geneticamente para produzir SDF-1, ou um agonista de atividade de SDF-1, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica.

26. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende SDF-1, ou um agonista de atividade de SDF-1, e um interferon, opcionalmente junto com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis, para tratamento e/ou prevenção de uma doença neurológica.

25 27. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende SDF-1, ou um agonista de atividade de SDF-1, e osteopontina, opcionalmente junto com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis, para tratamento e/ou prevenção de uma doença neurológica periférica.

30 28. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende SDF-1, ou um agonista de atividade de SDF-1, e clusterina, opcionalmente junto com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis, para tratamento e/ou prevenção de uma doença neurológica periférica.

RESUMO

Patente de Invenção: "**USO DE SDF-1 PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

5 A presente invenção refere-se ao uso de SDF-1, ou de um agonista de atividade de SDF-1, para o tratamento e/ou a prevenção de uma doença neurológica.